



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

FERNANDA DE MARIA SERRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO E GLÂNDULAS
ANEXAS MEDIANTE A EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA INALATÓRIA E ORAL DO
AGROTÓXICO GLIFOSATO EM RATOS**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

FERNANDA DE MARIA SERRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO E GLÂNDULAS
ANEXAS MEDIANTE A EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA INALATÓRIA E ORAL DO
AGROTÓXICO GLIFOSATO EM RATOS**

Tese apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Orientador: Dra Gisele Alborghetti Nai

636.089
S487a

Serra, Fernanda de Maria.

Avaliação da toxicidade ao trato digestório e glândulas anexas mediante a exposição subcrônica inalatória e oral do agrotóxico glifosato em ratos. / Fernanda de Maria Serra. – Presidente Prudente, 2021. 110f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Glifosato. 2. Sistema digestório. 3. Carcinoma *in situ*. I. Nai, Gisele Alborghetti. II. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mologni – CRB 8-6204

FERNANDA DE MARIA SERRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO E GLÂNDULAS
ANEXAS MEDIANTE A EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA INALATÓRIA E ORAL DO
AGROTÓXICO GLIFOSATO EM RATOS**

Tese apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de Concentração: Fisiopatologia Animal e Saúde Animal.

Presidente Prudente, 22 de janeiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Karina Maria Basso
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL
Londrina - PR

Profa. Dra. Monica Maria Bastos Paoliello
Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine
Nova York - EUA

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Odacir e Rosângela, por todo apoio e grande incentivo. Apesar de não serem oportunizados da mesma maneira que eu, me ensinaram o valor da educação, a importância da honestidade e o poder de sonhar!

Sem vocês isso não teria sentido!

AGRADECIMENTOS

À minha Mãezinha e o Senhor Jesus Cristo, por ter me dado forças e me mostrado a direção nos momentos mais difíceis, por ter iluminado essa trajetória maravilhosa por onde tenho caminhado e por ter cuidado de mim e de todas as pessoas que tem me ajudado durante todo esse tempo.

À minha orientadora, Prof^a Dra^a Gisele Alborghetti Nai, que caminha ao meu lado por tantos anos! Além de orientadora, tem sido amiga, conselheira e exemplo. É uma pessoa e profissional maravilhosa, sempre mostrando o caminho com bastante serenidade e amor. Tenho grande admiração e respeito pelo seu trabalho e sabedoria. Sou extremamente grata pela oportunidade.

Aos funcionários do laboratório de patologia, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta e Talita Rizo Pereira, que colaboraram com a realização dessa pesquisa. Exerceram muito mais que análises, compartilharam experiências e tornaram os dias mais leves.

Aos meus pais, Odacir Serra e Rosangela Aparecida de Maria Serra, que foram alicerces para todas as minhas conquistas. Receber apoio e colo me proporcionou muito conforto durante essa longa trajetória.

Aos meus irmãos, Bruno e Roberta, que sempre foram amigos e companheiros. Estiveram sempre ao meu lado vibrando por cada passo dado. O incentivo de vocês me deu esperanças para continuar.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante essa árdua jornada. A energia recebida durante todos esses anos e as comemorações a cada pequena conquista me motivaram a chegar até aqui.

Aos componentes da banca examinadora, Profa. Dra. Monica Maria Bastos Paoliello, Profa. Dra. Karina Maria Basso, Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes e Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, agradeço o tempo dedicado, pelas considerações e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

*"Qualquer coisa que você faça na vida será insignificante, mas é muito importante
que você o faça, porque ninguém mais o fará."*

Mahatma Gandhi

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Avaliação da toxicidade ao trato digestório e glândulas anexas mediante a exposição subcrônica inalatória e oral do agrotóxico glifosato em ratos

Introdução: Apesar dos estudos realizados pela indústria sugerirem que o glifosato é pouco tóxico para as espécies não alvo, pesquisas recentes colocam em dúvida a segurança do composto para a saúde de outras espécies. **Objetivo:** Avaliar as alterações histológicas, citológicas e morfométricas do sistema digestório e glândulas anexas, causadas pela exposição subcrônica por via oral e inalatória ao agrotóxico glifosato em ratos. **Material e métodos:** Para a realização dos experimentos, foram utilizados 88 ratos Wistar albinos, machos e fêmeas, adultos, distribuídos em nove grupos com dez animais cada (5 machos e 5 fêmeas), com exceção do grupo controle positivo, formado por 8 machos que receberam 50 mg/kg após 24h de experimento. Grupo Controle Inalatório, expostos à nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl) por aproximadamente 15 minutos, diariamente; Grupo Controle Oral, receberam ração nebulizada com solução de NaCl por aproximadamente 15 minutos; Grupo de Baixa Concentração Inalatório, expostos à nebulização ao agrotóxico com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), durante 15 minutos, diariamente; Grupo de Baixa Concentração Oral, receberam ração nebulizada com o agrotóxico com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) por aproximadamente 15 minutos; Grupo de Média Concentração Inalatório, expostos à nebulização ao agrotóxico com $6,19 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), durante 15 minutos, diariamente; Grupo de Média Concentração Oral, receberam ração nebulizada com o agrotóxico com $6,19 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), por aproximadamente 15 minutos; Grupo de Alta Concentração Inalatório, expostos à nebulização ao agrotóxico com $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), durante 15 minutos, diariamente; Grupo de Alta Concentração Oral, receberam ração nebulizada com o agrotóxico com $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), por aproximadamente 15 minutos. Foram coletados: sangue para realização de provas de função hepática e renal e fragmentos de boca, fígado, rim, baço, pâncreas e esôfago, estômago e intestino delgado e grosso para análise histopatológica. As células da medula óssea do fêmur foram coletadas para o teste do micronúcleo. **Resultados:** Houve a predominância de cariomegalia em fêmeas, na cavidade bucal. Na língua houve congestão, inflamação, aumento do número de mastócitos e do número de regiões organizadoras de nucléolos nos grupos expostos ao glifosato, independente do sexo dos animais ($p < 0,05$). Todos os animais expostos a alta concentração apresentaram displasia no esôfago. Na análise do intestino grosso, 80% dos animais do grupo exposto a média concentração inalatória e 88% dos animais do grupo exposto a média concentração oral e do grupo exposto a alta concentração inalatória, apresentaram displasia leve da mucosa, enquanto a displasia moderada foi observada em 22% dos animais do grupo exposto a alta concentração inalatória e em 100% do grupo exposto a alta concentração oral. No intestino delgado, displasia leve foi observada em 50% dos animais do grupo exposto a média concentração inalatória, 90% dos animais do grupo exposto a alta concentração inalatória e em 100% dos animais dos grupos expostos a média e alta concentração oral. Houve maior aumento de micronúcleos em fêmeas expostas a baixa concentração oral e

machos expostos a alta concentração inalatória. As fêmeas do grupo exposto a alta concentração oral apresentaram as maiores concentrações de AST, ALT, creatinina e ureia ($p < 0,05$). Esteatose hepática foi observada em todos os animais expostos à média e alta concentração de glifosato ($p < 0,05$). Todos os expostos ao glifosato apresentaram alteração tubular. Necrose tubular foi mais incidente nos animais do grupo exposto a alta concentração oral. A contagem de NORs (regiões organizadoras de nucléolos) no fígado e no rim, foi mais elevada nos animais expostos a altas concentrações de glifosato ($p < 0,05$). Não foram encontradas alterações no estômago, baço e pâncreas em nenhum dos grupos estudados.

Conclusão: O glifosato estimula processo inflamatório no trato digestório, pode provocar alergias bucais (principalmente nas fêmeas), lesões displásicas no esôfago e intestino delgado e grosso e tem potencial genotóxico, caracterizado pelo aumento de micronúcleos nos animais expostos. Em geral, a via oral provoca mais alterações no trato digestório que a via inalatória. Exposição a altas concentrações de glifosato, principalmente por via oral, causa maior dano hepático e renal, principalmente às fêmeas.

Palavras-chave: glifosato, sistema digestório, exposição ambiental, genotoxicidade, carcinogenicidade.

ABSTRACT

Evaluation of toxicity to the digestive tract and adnexal glands by means of subchronic inhalation and oral exposure of the herbicide glyphosate in rats

Introduction: Although studies carried out by the industry suggest that glyphosate is not very toxic for non-target species, but recent research has put into question the safety of the compound for the health of other species. **Objective:** To evaluate the histological, cytological and morphometric changes of the digestive system and attached glands, caused by subchronic oral and inhalation exposure to the herbicide glyphosate in rats. **Material and methods:** For the experiments, 88 adult male and female albino Wistar rats were used, distributed in nine groups with ten animals each (5 males and 5 females), with the exception of the positive control group, formed by 8 males that received 50 mg / kg after 24h of experiment.: Inhalation Control Group, exposed to nebulization with chloride solution sodium (NaCl) for approximately 15 minutes, daily; Oral Control Group, received nebulized feed with NaCl solution for approximately 15 minutes; Low Concentration Inhalation Group, exposed to nebulization to the herbicide with 3.71×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha), for 15 minutes, daily; Low Oral Concentration Group, received nebulized feed with the herbicide with 3.71×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha) for approximately 15 minutes; Medium Concentration Inhalation Group, exposed to nebulization to the herbicide with 6.19×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha), for 15 minutes, daily; Medium Oral Concentration Group, received nebulized feed with the herbicide with 6.19×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha), for approximately 15 minutes; High Concentration Inhalation Group, exposed to nebulization to the herbicide with 9.28×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha), for 15 minutes, daily; High Oral Concentration Group, received food nebulized with the herbicide with 9.28×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha), for approximately 15 minutes. Blood was collected for liver and kidney function tests and fragments of the mouth, liver, kidney, spleen, pancreas and esophagus, stomach and small and large intestine for histopathological analysis. Femoral bone marrow cells were collected for the micronucleus test. **Results:** There was a predominance of karyomegaly in females, in the oral cavity. In the tongue there was congestion, inflammation, an increase in the number of mast cells and the number of nucleolus organizing regions in the groups exposed to glyphosate, regardless of the sex of the animals ($p < 0.05$). All animals exposed to high concentration showed dysplasia in the esophagus. In the analysis of the large intestine, 80% of the animals in the group exposed to medium inhalation concentration and 88% of the animals in the group exposed to medium oral concentration and in the group exposed to high inhalation concentration, presented mild mucosal dysplasia, while moderate dysplasia was observed in 22% of the animals in the group exposed to high inhalation concentration and in 100% of the group exposed to high oral concentration. In the small intestine, mild dysplasia was observed in 50% of the animals in the group exposed to medium inhalation concentration, 90% of the animals in the group exposed to high inhalation concentration and in 100% of animals in the groups exposed to medium and high oral concentration. There was a greater increase in micronuclei in females exposed to low oral concentration and males exposed to high inhalation concentration. Females in the group exposed to high oral concentration had the highest concentrations of AST, ALT, creatinine and urea ($p < 0.05$). Liver steatosis was

observed in all animals exposed to medium and high glyphosate concentration ($p < 0.05$). All those exposed to glyphosate showed tubular changes. Tubular necrosis was more prevalent in animals in the group exposed to high oral concentration. The count of NORs (nucleus organizing regions), in the liver and kidney, was higher in animals exposed to high concentrations of glyphosate ($p < 0.05$). No changes were found in the stomach, spleen and pancreas in any of the groups studied.

Conclusion: Glyphosate stimulates an inflammatory process in the digestive tract, can cause oral allergies (mainly in females), dysplastic lesions in the esophagus and small and large intestine and has genotoxic potential, characterized by an increase in micronuclei in exposed animals. In general, the oral route causes more changes in the digestive tract than the inhalation route. Exposure to high concentrations of glyphosate, mainly orally, causes greater liver and kidney damage, especially to females.

Keywords: glyphosate, digestive system, environmental exposure, genotoxicity, carcinogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1- Principais consumidores de agrotóxicos, defensivos por área Cultivada e agroquímicos por produção agrícola no mundo.....	14
---	----

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
REFERÊNCIAS.....	22
2 ARTIGO 1	24
3 ARTIGO 2	56
ANEXOS	80
ANEXO A– APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DA ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....	80
ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO – ARTIGO 1 - ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH.....	81
ANEXO C – NORMAS DE PUBLICAÇÃO - ARTIGO 2 – COMPARATIVE MEDICINE.....	102

1 REVISÃO DA LITERATURA

Nas últimas décadas o mundo passou pelo advento da modernização, avanços na tecnologia para produções em largas escalas e esse momento refletiu diretamente na agricultura, sendo acompanhada pelo uso intenso de agroquímicos. Os agrotóxicos são utilizados com diferentes finalidades, causando diversas consequências para os seres vivos, como perda de peso, efeitos no sangue e pâncreas e carcinogenicidade em seres humanos (MORIN; STUMM, 2016; AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Durante a revolução verde, que aconteceu entre as décadas de 1960 e 1980 houve grandes investimentos em tecnologias e incentivo ao uso de agrotóxico através de medidas governamentais que ofereceram créditos aos agricultores e instalação de empresas internacionais deste setor no país (MORIN; STUMM, 2016).

Os agrotóxicos são utilizados por produtores de gado, indústrias alimentares, higiene pessoal e uso doméstico, com o objetivo de combater o desenvolvimento de ervas daninhas. Além disso, independentemente do tipo de agrotóxico, todos têm certas características, tais como toxicidade, persistência, bioacumulação, capacidade de migração entre outras, que os tornam prejudiciais ou benéficos tanto para os recursos naturais, como para os homens (FUNDACENTRO, 2020).

O uso de agrotóxicos nas produções de larga escala tornou-se indispensável para a manutenção da vida e da saúde. Uma produção em larga escala para evitar grandes crises econômica no setor alimentar e consequentemente a fome, traz consigo muitos danos, como a agressão aos ecossistemas – solo, água e ar – além de efeitos a saúde da população a médio e longo prazo (TEIXEIRA; PAULA; NAPOLITANO, 2019).

Em números absolutos, o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos de mundo e utiliza mais de 500 mil toneladas de agrotóxicos por ano (IBGE, 2015). Quando é considerado a quantidade de alimento produzido e a área plantada, entende-se que o volume de veneno aplicado é proporcionalmente menor. A ocorrência de um clima tropical durante quase o ano todo e um inverno curto, favorece a propagação de pragas durante o ano inteiro (Figura 1) (VASCONCELOS, 2018).

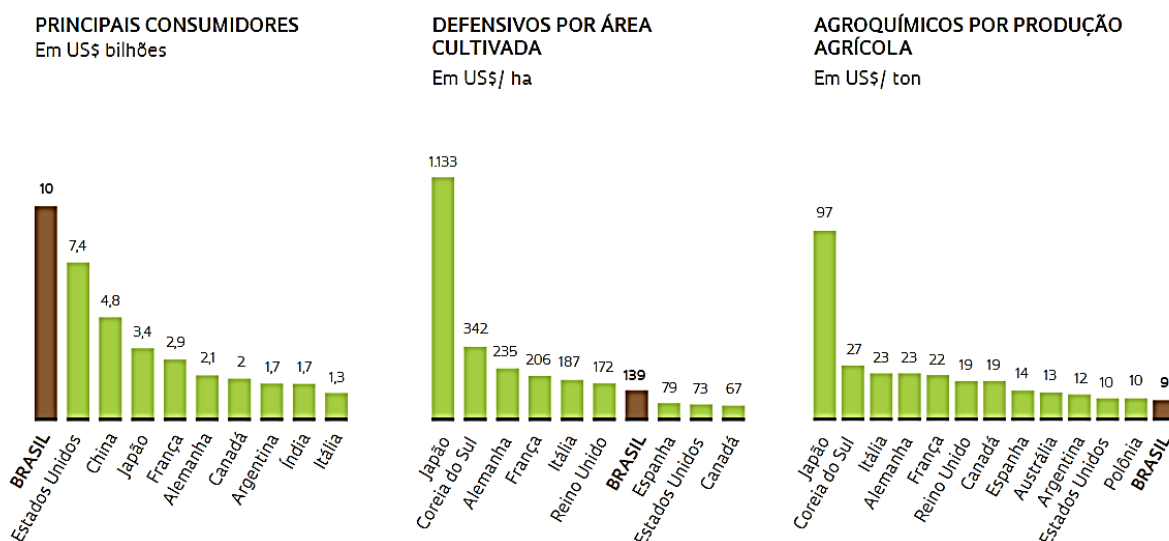


Figura 1 - Principais consumidores de agrotóxicos, defensivos por área cultivada e agroquímicos por produção agrícola no mundo. (Pesquisa Fapesp, n. 271, 2018. US\$: dólares; ha: hectares; ton: toneladas.)

A região do Paranapanema abriga a produção da cana de açúcar desde a década de 70 e desde então o estado de São Paulo tornou-se emblemático na agricultura com a expansão dessa monocultura. O incentivo veio do Programa Nacional do Alcool – PROALCOOL – que levou grandes transformações para a região. Essas lavouras recebem quantidade muito grande de agrotóxicos durante toda a produção (BARRETO; THOMAZ JÚNIOR, 2015).

Legislação

O uso de agrotóxicos na primeira metade do século XX ocorreu com pouca ou nenhuma fiscalização ou regulamentação pública, com a promessa de aumentar a produção e acabar com a fome no mundo todo (TEIXEIRA; PAULA; NAPOLITANO, 2019; SOARES *et al.*, 2019). Foi na década de 60 que começou a ser questionado quais seriam os malefícios a saúde da população que esse uso descontrolado e excessivo poderia estar causando (SOARES *et al.*, 2019).

No Brasil, em 1989, foi publicada a Lei dos Agrotóxicos (Lei nº 7.802), que proibiu o registro de agrotóxicos que possuíam características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas. Os produtos que possuísem organoclorados em sua composição deveriam ser imediatamente avaliados (TEIXEIRA; PAULA; NAPOLITANO, 2019).

Em 1996, a portaria nº 84 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), estabeleceu uma classificação de Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA), utilizando diversos parâmetros, como bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico, divididos em quatro classificações: produto altamente perigoso (1), produto muito perigoso (2), produto perigoso (3) e produto pouco perigoso (4) (TEIXEIRA; PAULA; NAPOLITANO, 2019). Alguns produtos juntamente com o Dicloro-Difenil-Tricloroetano, que é um organoclorado, foram permitidos até 2009 em produtos de limpeza. Nesse ano a proibição veio a partir da Lei nº 11.936 (TEIXEIRA; PAULA; NAPOLITANO, 2019).

Após o levantamento de dados científicos sobre os efeitos do glifosato pela ANVISA, foi aprovado em fevereiro de 2019 uma consulta pública. Mais de 50% dos brasileiros votaram pela proibição do registro de agrotóxicos com esse composto. A reavaliação desse produto foi registrada desde 2008 e após 10 anos a ANVISA não havia liberado nenhuma alteração nos registros (BRASIL, 2019).

A ANVISA realiza avaliações dos ingredientes ativos que compõe os agrotóxicos desde 2006. Para uma melhor definição de segurança, o glifosato foi reavaliado em 2020 e foi mantido, ainda com algumas restrições (ANVISA, 2020). Mesmo sendo um produto proibido ou parcialmente proibido em mais de 20 países (SUSTAINABLE PULSE, 2019), a ANVISA e o Ministério da Saúde, por meio da RDC Nº 441 de 02 de dezembro de 2020, solicitaram apenas alterações na monografia do ingrediente, como:

- “I - Inclusão do formaldeído, na concentração de 1,0 g/Kg, entre os contaminantes de importância toxicológica para o ingrediente ativo, mantendo-se o N-nitrosoglifosato na concentração de 0,001 g/Kg;
- II - Inclusão da definição de resíduos de Glifosato para conformidade com o Limite Máximo de Resíduo (LMR) como Glifosato;
- III - inclusão da definição de resíduos de Glifosato para avaliação do risco dietético como a soma de Glifosato e AMPA, expressos como Glifosato;
- IV - Inclusão do Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (Acceptable Operator Exposure Level - AOEL) de 0,1 mg/kg de peso corpóreo por dia;
- V - Inclusão da Dose de Referência Aguda (DRfA) de 0,5 mg/kg de peso corpóreo; e
- VI - Alteração da Ingestão Diária Aceitável (IDA) para 0,5 mg/kg de peso corpóreo.” (BRASIL, 2020)

Agrotóxicos, meio ambiente e saúde humana

O uso de agrotóxicos causa impacto muito grande, não só aos trabalhadores envolvidos na produção, como também aos consumidores. Alguns alimentos possuem resíduos de agrotóxicos acima do nível permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014). A contaminação por esses químicos vai muito além, pois causa desequilíbrio ambiental: contamina solos, mananciais, ar, fauna e flora; e podem causar efeitos por diferentes vias, como inalatória, dérmica e oral (FRIEDRICH, 2014; SOARES *et al.*, 2019).

Pessoas que trabalham ou moram próximas às regiões de pulverização desses agrotóxicos estão ainda mais suscetíveis aos efeitos decorrentes da exposição aos agrotóxicos, que podem ser divididos em três grandes grupos, de acordo com a frequência de exposição. A exposição única pode causar efeitos agudos com manifestação nas primeiras 24 horas após o contato com o agrotóxico. A exposição repetida em um período inferior a três meses causa efeito subcrônico. Os efeitos crônicos decorrem da exposição repetida em um período maior que três meses, em geral a doses menores e causam manifestações após semanas, meses ou anos (FRIEDRICH, 2014).

Em geral, acidentes, tentativas de suicídio e exposição através da pulverização podem causar efeito agudo. Há também variações, como efeitos subagudos, subcrônicos, quando as exposições ocorrem por dias, semanas ou meses (FRIEDRICH, 2014).

Os efeitos tóxicos dos agrotóxicos têm sido amplamente relatados. Em adultos com intoxicação aguda por agrotóxicos foi observada a presença de dores de cabeça, tonturas, distúrbios gastrointestinais, náuseas, vômitos, constrição da pupila, sudorese excessiva, alergias, problemas respiratórios e salivação. Em situações mais graves, os sintomas são fraqueza e contração muscular, problemas endócrinos, reprodutivos ou neurológicos, alterações na frequência cardíaca e broncoespasmo, surgimento de neoplasias, suicídios, convulsões e coma (MUÑOZ QUEZADA, 2011; SOARES *et al.*, 2019).

Alguns efeitos crônicos de organofosforados e DDT (diclorodifeniltricloroetano) em trabalhadores agrícolas se manifestam como as deficiências: cognitivas, emocionais, motoras e de funções sensoriais. Alguns estudos mostram os efeitos nocivos sobre alterações citogenéticas e reprodutivas,

efeitos teratogênicos sobre filhos de trabalhadores agrícolas, e ocorrência mais frequente de câncer na infância, além de muitos distúrbios neurocomportamentais e efeitos endócrinos e imunotóxicos em crianças que vivem em ambientes rurais (MUÑOZ QUEZADA, 2011).

Os altos índices de produção agrícola alcançados pelo Brasil demandam o uso intenso de agrotóxicos de variadas composições químicas. Com a constante abertura de novas fronteiras, a agricultura intensiva praticada no país vem batendo recordes de produção que, paralelamente, refletem num crescente volume de agrotóxicos comercializados em território brasileiro. Segundo estatísticas, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e o grupo dos agrotóxicos é o mais comercializado mundialmente. No Brasil, 127 mil toneladas desse grupo foram comercializadas em 2009, sendo o glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) os mais comercializados oficialmente (MACEDO NETO; FROEHNE; MACHADO, 2012).

O glifosato é um agrotóxico não seletivo e isso significa que a planta não é capaz de metabolizar esse composto, o que faz com que quase a totalidade de ingredientes utilizados chegue até o solo em sua forma original. Em alguns estudos foi relatado que o tempo de meia vida de degradação do glifosato no solo tem variação entre três e 142 dias, dependendo do tipo de solo, composição orgânica, inorgânica, textura, pH, entre outras. Isso faz com que o glifosato permaneça no ambiente até sua completa mineralização e pode levar a contaminação de mananciais e até diminuição na produtividade de algumas plantas (TONI *et al.*, 2006).

Agrotóxico glifosato

O agrotóxico glifosato N-(fosfonometil) glicina ($C_3H_8NO_5P$), possui massa molar de 169,1 g/mol e é não-seletivo, sistêmico e pós emergente. Possui alta eficiência no combate de ervas daninhas, perenes, monocotiledôneas e dicotiledôneas é um dos mais utilizados no mercado mundial, correspondendo a 60% de uso dos agrotóxicos da mesma classe. É um sal isopropilamônio e pode ser produzido com sal de amônio ou sódio. Em temperatura ambiente é muito solúvel em água, sendo vendido em concentrações de 48% (m/v) (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002; SILVA, 2014).

O glifosato é composto por diferentes estruturas cristalinas e isso permite o registro de diversas formulações (patentes). Apesar de possuírem o mesmo princípio ativo, possuem diferença na estrutura (polimorfismo). Ele atua como inibidor enzimático e foi sintetizado pela primeira vez em 1950, por Henri Martin. É o agrotóxico mais vendido mundialmente, com a venda três vezes maior que o segundo colocado – 2,4-D. O controle de 80% da comercialização mundial desse agrotóxico pertence a Monsanto Corporation, com o nome de Roundup. Dentre as propriedades desse agrotóxico estão o dessecamento de pastagens e florestas (TONI *et al.*, 2006; MESNAGE; ANTONIOU, 2017; TEIXEIRA; PAULA; NAPOLITANO, 2019).

A inibição específica da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase, diminui síntese proteica e desregula a via do chiquimato. Quando o glifosato inibe a EPSP sintase, o chiquimato (substrato desfosforilado da enzima) acumula-se em folhas, flores e raízes. Esse acúmulo tem sido considerado o efeito primário do agrotóxico nas plantas, que devido ao amplo espectro não discrimina o que está sendo cultivado e as pragas, tendo assim o uso limitado apenas em culturas resistentes a ele (MESNAGE; ANTONIOU, 2017).

Em 1996, as vendas do glifosato aumentaram exponencialmente devido a introdução de novas *Roundup Ready*, que são as novas culturas que toleram a aplicação do glifosato nas lavouras. Entre elas estão o milho, a soja, canola, algodão, açúcar, beterraba, entre outras. Não fazia sentido o uso desse agrotóxico nos anos anteriores, pois não havia contribuição de forma positiva (MESNAGE; ANTONIOU, 2017).

Agrotóxico Glifosato: Toxicidade

Em 2016, o glifosato encontrava-se na classe toxicológica IV, sendo considerado pouco tóxico aos seres vivos e, à classe de periculosidade ambiental III, sendo um produto perigoso ao meio ambiente (ANVISA, 2016).

Existe controvérsia na literatura sobre os efeitos maléficos que são causados pelo agrotóxico glifosato. As conclusões às quais chegam os autores podem ser baseadas em fatos ou interesse; no primeiro caso, os estudos são baseados em exposição e relato de efeitos tóxicos relatados abaixo do limite regulamentado; já no segundo caso ocorre quando há influência de interesses comerciais, de marketing

ou ideológicos escusos. Isso gera confusão e necessidade de refutar alguns dados apresentados a fim de esclarecer e melhorar a fiscalização e regulamentação sobre os riscos de exposição para os seres humanos (MESNAGE; ANTONIOU, 2017).

A exposição a este agrotóxico pode ocorrer pelas vias digestiva, dérmica e mucosa. Em relação à toxicocinética, o glifosato é metabolizado principalmente em AMPA (ácido aminometilfosfônico) que aparece no plasma cerca de 3,5 horas após a ingestão. Ambos, glifosato e seu metabólito, são excretados através da urina em até sete dias. Sobre os mecanismos de toxicidade, ele é um agrotóxico sistêmico do grupo das glicinas substituídas que age sobre o citocromo P-450 alterando a síntese da membrana celular, tanto em vegetais como em mamíferos (MONSANTO, 2020).

Mecanismos de Ação, Absorção e Excreção do Glifosato em Animais de Laboratório

Em relatos dos próprios fabricantes do glifosato, após a administração via oral de glifosato radiomarcado em dose única em ratos, houve uma absorção menor que 40% da dose e menos de 0,3% foi eliminada como gás carbônico (CO₂). Em outros relatos com ratos, com administração via oral de glifosato radiomarcado em dose única, houve a excreção maior que 97% através da urina e das fezes, sendo encontrado nas fezes em até 120 dias após a administração. Concluíram que a eliminação biliar não é significativa (MONSANTO, 2020).

O glifosato apresenta um grau muito baixo de biotransformação e o único metabólito encontrado na urina e fezes após a administração da dose de glifosato radiomarcado, com concentrações menores que 0.5%, foi o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Menos de 1% da dose absorvida foi encontrada nos tecidos e órgãos, principalmente nos tecidos ósseos (MONSANTO, 2020).

Efeitos da Exposição Aguda ao Glifosato

A dose letal mediana (DL50) oral do glifosato é uma concentração maior que 5000 mg/kg peso corporal (para ratos fêmeas), a DL50 dérmica é uma concentração maior que 5000 mg/kg peso corporal (para ratos machos e fêmeas) e a concentração letal mediana (CL50) inalatória é maior que 2,17 mg/L (para ratos

machos e fêmeas). Este agrotóxico foi considerado como um irritante dérmico leve, altamente irritante para os olhos e sem sensibilização cutânea (MONSANTO, 2020).

Efeitos da Exposição Crônica ao Glifosato

Segundo a bula do glifosato, não foram relatadas reações comportamentais ou sinais toxicológicos relacionados ao uso deste agrotóxico administrado à dieta de camundongos por 90 dias. Além disso, em exames macroscópicos na necropsia e as avaliações histopatológicas não foram observadas quaisquer alterações relacionados à administração do produto. Um estudo com exposição crônica conduzido com cães não mostrou efeito adverso em nenhum dos níveis de dosagem testados (MONSANTO, 2020).

A exposição a este agrotóxico pode gerar alterações nos parâmetros hepáticos, tais como aumento de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase; sendo que a exposição crônica pode causar disfunção do fígado. Isso ocorre devido ao mecanismo de toxicidade do composto, que aumenta a permeabilidade da membrana, causando desregularização de íons (COELHO, 2017).

Quando absorvido pelo organismo, através da derme ou por via oral, a principal forma de excreção é a urina, o que pode gerar toxicidade direta aos rins. Em um estudo realizado por Roman *et al.* (2009), foram utilizados camundongos, fêmeas, *Swiss* que foram acasaladas com machos da mesma espécie em seu período reprodutivo. As fêmeas foram expostas a doses baixa, média e elevada do agrotóxico e ao final do experimento foi recolhido material para análise. Segundo o autor, foram encontradas alterações associadas a exposição do agrotóxico no “epitélio do túbulo contorcido proximal e distal, vacuolização citoplasmática nos túbulos, homogeneidade entre os túbulos, hemorragias intersticiais e nos glomérulos e dilatação no espaço capsular”. O autor relata que as alterações foram observadas durante toda gestação, proporcionais a dose de agrotóxico a qual os animais foram expostos (ROMAN *et al.*, 2009).

Agrotóxico Glifosato: Mutagenicidade, genotoxicidade e câncer

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA - US), o agrotóxico glifosato possuía evidências limitadas de carcinogenicidade em seres humanos e foi classificado como possivelmente cancerígeno para humanos (Grupo C) em 1985. Após uma reavaliação dos estudos, houve mudança na classificação para evidência de não cancerígeno em seres humanos (Grupo E) em 1991. Após isso, o grupo da IARC realizou a avaliação e considerou os resultados significativos do relatório da EPA e vários resultados positivos mais recentes na conclusão de que há suficiente evidência de carcinogenicidade em animais experimentais. O glifosato também causou alterações no DNA e danos em células humanas, embora tenha dado resultados negativos em testes usando bactérias. Um estudo na comunidade relatou aumento de micronúcleos no sangue após a pulverização de glifosato nas proximidades (IARC, 1987).

O agrotóxico glifosato é um dos produtos mais utilizados para pulverização de lavouras no Brasil e no mundo, além de ser utilizado vastamente na região do Paranapanema, que contribui de forma significativa na produção agrícola do Estado de São Paulo. Devido as grandes divergências na literatura quanto à importância do uso para a produção agrícola e riscos que causam a saúde de trabalhadores, moradores locais e consumidores dos produtos, realizamos um estudo com exposição sub-crônica ao glifosato, visando esclarecer os riscos que este pode trazer à saúde.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) – relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Brasília: ANVISA, 2014.

ANVISA. **Anvisa irá reavaliar glifosato e outros quatro agrotóxicos utilizados no país**. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2016/anvisa-ira-reavaliar-glifosato-e-outros-quatro-agrotoxicos-utilizados-no-pais>. Acesso em: 18 fev. 2021.

ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 441, de 2 de Dezembro de 2020**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-441-de-2-de-dezembro-de-2020-293190758>. Acesso em: 17 fev. 2021.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, jul de 2002.

BARRETO, M. J.; JUNIOR, A. T. As incertezas do trabalho nos canaviais da região do Pontal do Paranapanema-SP. **Revista Pegada**, v. 16, n. esp., p. 16-28, mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria Colegiada. Resolução - RDC Nº 441, de 2 de dezembro de 2020. **Diário Oficial da União**, de 09 dez. 2020. Edição 235, Seção 1, p. 372.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria Colegiada. Consulta pública nº 613, de 28 de fevereiro de 2019. **Diário Oficial da União**, de 01 mar. 2019. Edição 43, Seção 1, p. 68.

COELHO, M. C. R. S. **Glifosato, saúde e ambiente – uma revisão**. 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2017.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D**. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2014. 45p. (Parecer técnico)

FUNDACENTRO. **Toxicologia ocupacional**. São Paulo: Fundacentro, 2020.

MONSANTO DO BRASIL LTDA. **Glifosate**. São Paulo: MONSANTO, 2020.

IARC. Chlorophenoxy herbicides (Group 2B). **Monographs Supplement**, 7, 1987.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática- Produção Agrícola Municipal**. Brasília: IBGE, 2015.

MACEDO NETO, D.; FROEHNE, S.; MACHADO, K. S. Avaliação do transporte do ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p.1809-1813, 2012.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. **Frontiers in Public Health**, v. 5, p. 1-7, 2017.

MORIN, P. V.; STUMM, E. M. F. Common mental disorders in rural workers who use pesticides: a cross-sectional study. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 15, p. 553-55, nov. 2016.

MUÑOZ QUEZADA, M. T. Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile. **Acta Bioethica**, v.17, n.1, pp.95-104, 2011.

ROMAN, S. S.; SCOLARI, S.; BERGAMIN, N. A.; SACHETTI, C. G. Toxicidade renal e hepática em camundongos prenhes expostos à associação do ácido 2,4 diclorofenoxiacético e do glifosato. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 152-171, 2009.

SILVA, M.R.L.R. Avaliação da toxicidade celular do herbicida glifosato em *Astyanax* spp. **Saúde Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 62-69, 2014.

SOARES, M. M. A.; ZUCHI, A. P.; LOPES, C. V. A. I.; ANJOS, M. C. R. Percepção de conselheiros de saúde acerca do tema agrotóxicos: o papel da participação social em uma sociedade que adocece. **Saúde e Sociedade**, v. 28, n. 1, p. 337-349, 2019.

SOUZA, A. D.; MEDEIROS, A. D. R.; SOUZA, A. C. D.; WINK, M. R.; SIQUEIRA, I. R.; FERREIRA, M. B. C. e TORRES, I. L. D. S. Avaliação do impacto da exposição a agrotóxicos sobre a saúde de população rural: Vale do Taquari (RS, Brasil). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3519-3528, 2011.

SUSTAINABLE PULSE. **Glyphosate Herbicides Now Banned or Restricted in 21 Countries Worldwide – Sustainable Pulse Research**. 2019. Disponível em: <https://sustainablepulse.com/2019/05/28/glyphosate-herbicides-now-banned-or-restricted-in-17-countries-worldwide-sustainable-pulse-research/#.YC6Ktmij9Pa>. Acesso em: 17 fev. 2021.

TEIXEIRA, D. E.; PAULA, R. L. G.; NAPOLITANO, H. B. Legislação e Normatização para o Glifosato no Brasil. **Revista Processos Químicos**, v. 13, n. 25, p. 105-116, 2019.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, DIMAS, A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, jul. 2006.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda. **Revista Pesquisa Fapesp**, São Paulo, Ano 19, n. 271, p. 18-27, set. 2018.

ARTIGO 1**EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO AGROTÓXICO GLIFOSATO EM RATOS WISTAR
CAUSA DISPLASIA NO TRATO DIGESTÓRIO**

Título resumido: **DISPLASIA DO TRATO DIGESTÓRIO E GLIFOSATO**

Fernanda de Maria Serra¹, José Luiz Santos Parizi^{2,3}, Gisele Aparecida Sales de Mello⁴, Grace Mitiko Rosati Hori Sato⁴, Isabela Bocardi Patrão⁴, Pedro Henrique Nahas Chagas³, Fabíola de Azevedo Mello¹, Gisele Alborghetti Nai^{1,2,3,4}.

¹Graduate Program in Animal Science, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

²Department of Pathology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

³Faculty of Medicine of Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁴Faculty of Dentistry of Presidente Prudente (FOPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

Correspondence: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

RESUMO

O glifosato é o agrotóxico mais vendido do mundo e causa diversos impactos ao meio ambiente e a saúde da população. Devido ao perigo desse composto e o uso indiscriminado, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos ao trato digestório mediante exposição inalatória e oral subcrônica ao agrotóxico glifosato em ratos. Seis grupos de ratos Wistar (machos e fêmeas) foram expostos à nebulização com três concentrações diferentes de glifosato por via oral e inalatória durante 75 dias. Coletaram-se células da medula óssea, esfregaços da língua e fragmentos da língua, esôfago, estômago e intestino para análise histopatológica. Na língua houve congestão, inflamação, aumento do número de mastócitos e do número de regiões organizadoras de nucléolos nos grupos expostos ao glifosato, independente do sexo dos animais. Animais dos grupos expostos tanto a via inalatória, quanto a via oral do glifosato apresentaram displasia no esôfago e do intestino delgado e grosso. Alterações gástricas não foram observadas. Diante disso, concluímos que a exposição ao glifosato estimula o processo inflamatório no trato digestório, pode provocar alergias bucais, lesões displásicas no esôfago e intestinos, além de apresentar um potencial genotóxico.

Palavras-chave: agrotóxico, displasia, genotóxico, intestino, trato digestório.

Introdução

O agrotóxico glifosato [N-(fosfonometil)glicina ($C_3H_8NO_5P$)] possui alta eficiência no combate de ervas daninhas, perenes, monocotiledôneas e dicotiledôneas e é um dos mais utilizados no mercado mundial, correspondendo a 60% do uso dos agrotóxicos da mesma classe (Benbrook 2016; Conrad et al. 2017). O glifosato é uma das substâncias ativas mais vendidas para uso doméstico (Conrad et al. 2017).

O uso frequente desse agrotóxico, tanto para uso doméstico, quanto em lavouras, resulta na ideia de que os efeitos são apenas sobre ervas daninhas, sem consequências para biodiversidade (Chlopecka et al. 2014). Apesar dos estudos realizados pela indústria produtora do glifosato sugerirem que o glifosato é pouco tóxico para as espécies não alvo, as pesquisas científicas realizadas com o glifosato apontam efeitos deletérios a partir das intoxicações e colocam em dúvida a segurança do composto para a saúde de outras espécies. Há estudos mostrando que o glifosato causa várias alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas células, inclusive de mamíferos (Chlopecka et al. 2014). O glifosato pode causar estresse oxidativo no organismo e consequentemente lesar os órgãos e favorecer o surgimento de câncer (Landrigan e Belpoggi. 2018).

Os riscos e danos provocados por agrotóxicos não atingem apenas os trabalhadores, atingem também a população geral que podem sofrer as consequências pelo consumo diário de alimentos contaminados por agrotóxicos (EPA 1993). Resíduos de glifosato podem ser encontrados nos alimentos, na água potável e no sangue e na urina dos seres humanos (Qiu et al. 2020). Por isso, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA) determinou que a ingestão diária aceitável é de 0,5 mg / kg / dia e que o limite para a água potável é de 0,1 µg glifosato / L (EFSA 2015).

O sistema digestório é um dos sistemas orgânicos afetados pela exposição aos agrotóxicos. A ocorrência de gastrite e outros problemas gastrointestinais são os mais prevalentes na maioria da população exposta a agrotóxicos. (Landrigan e Belpoggi 2018).

A partir de tais informações da literatura científica, hipotetizamos que o agrotóxico glifosato possa causar alterações histológicas no trato digestório e que a

via de exposição (inalatória ou oral) e o sexo dos animais possa influenciar nestas alterações.

Considerando a prevalência dos efeitos gastrintestinais nas populações expostas a agrotóxicos, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos causados pela exposição subcrônica oral e inalatória ao agrotóxico glifosato para o trato digestório, utilizando doses relevantes à exposição humana.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade do Oeste Paulista (Protocolo nº 3792) (Anexo A).

Animais, manutenção e exposição

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 88 ratos Wistar albinos, machos e fêmeas, adultos, com peso entre 200-250g, alocados em gaiolas plásticas, separados por sexo, temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 15\%$, com ciclos de 12 horas de claro e escuro (National Research Council 2011).

A exposição ao agrotóxico glifosato foi feita com Glifosato [N-(phosphonomethyl) glycine] (Roundup Original DI, Monsanto, São Paulo, Brasil), com a seguinte composição: Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO): 445 g/L (44,5% m/v); Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO): 370 g/L (37,0% m/v); Outros Ingredientes: 751 g/L (75,1% m/v).

Nos grupos controle, a nebulização foi realizada com solução de cloreto de sódio (NaCl); nos grupos expostos a baixa concentração, a nebulização foi realizada com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de glifosato [correspondendo a 27,05 partes por milhão (ppm)] diluídos em 10mL de cloreto de sódio. Nos grupos expostos a média concentração, a nebulização foi realizada com $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha de glifosato (correspondendo a 45,27ppm) diluídos em 10mL de cloreto de sódio; e nos grupos expostos a média concentração, a nebulização foi realizada com $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a 67,54ppm) diluídos em 10mL de cloreto de sódio.

As diferentes concentrações do agrotóxico glifosato de cada grupo foram baseadas nas diferentes concentrações utilizadas durante a aplicação da lavoura e

estão descritas na sua bula do produto. Cada dose foi ajustada para a área da caixa, para simular a exposição ambiental (ocupacional e de alimentos).

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (machos: n=5/ grupo; fêmeas: n=5/ grupo):

- IC - Grupo Controle Inalatório;
- OC - Grupo Controle Oral;
- IL - Grupo de Baixa Concentração Inalatório;
- OL - Grupo de Baixa Concentração Oral;
- IM - Grupo de Média Concentração Inalatório;
- OM - Grupo de Média Concentração Oral;
- IH - Grupo de Alta Concentração Inalatório;
- OH - Grupo de Alta Concentração Oral.

Nos grupos de exposição inalatória, todos os animais do mesmo grupo foram expostos à nebulização simultaneamente e nos grupos expostos por via oral, a ração foi exposta a nebulização 24h antes de ser oferecida aos animais.

As nebulizações foram realizadas sempre no mesmo horário, foram utilizadas duas caixas de polipropileno (32x 24x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star®, Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil) (Mello et al. 2018) para simular a pulverização das lavouras.

O tempo necessário para nebulização de toda a solução foi de 15 minutos, tanto para os animais quanto para a ração. Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados durante cinco dias seguidos na semana, simulando a exposição ocupacional. A ração dos animais expostos por via oral foi trocada a cada dois dias, sendo que a nebulização foi realizada um dia antes da ração ser ofertada aos animais (Figura 1). Foi ofertado 600g de ração por caixa e a ração não consumida foi pesada a cada troca. Os animais foram pesados no início e no final do experimento e distribuídos em caixas sem a mistura de sexos, além de serem separados por grades no momento da nebulização.

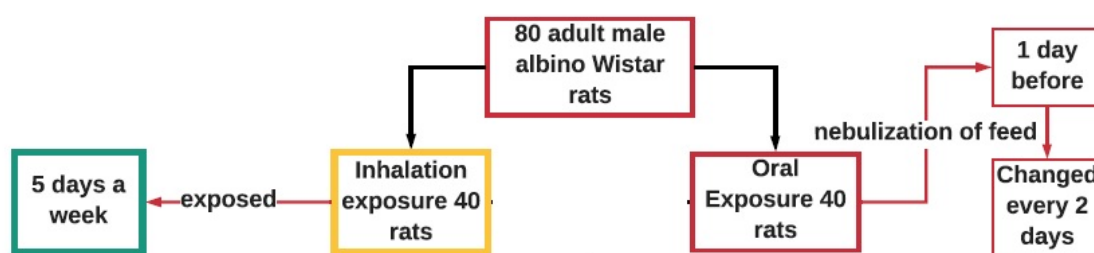


Figura 1 - Delineamento experimental do estudo.

Ao final dos 75 dias de experimento, foi realizada anestesia com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg de peso, administrado na cavidade peritoneal. Os indicativos de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos (National Research Council 2011).

Análise citopatológica

Após a eutanásia, foi colhido material com escova citológica - *cytobrush* (Medical Burs, Indústria e Comércio de Produtos Abrasivos Ltda, Cotia, São Paulo Brasil) do dorso da língua. Após a coleta, o material foi estendido em lâminas de vidro, fixado ao ar e as lâminas foram coradas com a coloração de Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (MacGregor 1987). A análise foi realizada com microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão) em um aumento de 400x. Foram avaliadas as seguintes alterações nucleares, contadas em 100 células epiteliais: micronúcleos [segundo os critérios estabelecidos por Tolbert et al. (1992)], cariomegalia e binucleação.

Análise histopatológica

Posteriormente, foram retirados a língua, esôfago, estômago e intestino delgado e grosso de cada animal. Os fragmentos retirados foram fixados em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes seriados de 5µ foram obtidos por micrótomo LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

Cortes adicionais da língua foram corados pela coloração de azul de toluidina (Merck, Darmstadt, Alemanha) para identificação dos mastócitos. Outras seções desparafinizadas da língua também foram coradas por impregnação com prata, de acordo com Ploton et al. (1986), para avaliação das NORs (regiões organizadoras de nucléolos).

A análise histopatológica foi cega e realizada por um único observador experiente, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão). Os parâmetros gerais avaliados na língua, esôfago, estômago e intestino delgado e grosso com seus respectivos escores foram: infiltrado inflamatório intersticial (ausente, leve, moderada, intensa) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou monucleares); congestão tecidual (ausente, leve, moderada, intensa); necrose tecidual (ausente, presente e focal, presente e difusa); necrose vascular (ausente, presente); alterações não neoplásicas da mucosa (atrofia, hiperplasia e metaplasia: ausente, presente); lesões displásicas (ausente, displasia leve, displasia moderada, displasia severa) e presença de lesões neoplásicas benignas e malignas (ausente, benigna, maligna) (Pegoraro et al. 2018).

Também foram analisados especificamente, os seguintes parâmetros:

- Língua: presença de hiperkeratose (definida como o aumento da camada córnea) (ausente, leve, moderada, acentuada), presença de parakeratose (definida como um processo anormal de maturação de células epiteliais, onde ocorre a retenção de núcleos na camada córnea) (ausente, focal, difusa) (Martelli et al. 2014);
- Esôfago: presença de hiperkeratose (ausente, leve, moderada, acentuada), presença de parakeratose (ausente, focal, difusa) (Nai et al. 2015);
- Intestino: hiperplasia linfóide (ausente, presente) (Pegoraro et al. 2018).

Análise histomorfométrica da língua

Foram realizadas as seguintes análises histomorfométricas na língua:

- Medidas da espessura do epitélio da língua, realizadas em duas áreas da região dorsal e em duas do ventre (Martelli et al. 2014);

- Contagem de mastócitos, em 10 campos de grande aumento (CGA), correspondendo à cerca de 1mm^2 (Parizi et al. 2010);
- Contagem de NORs, em 10 células/CGA, num total de 100 células por animal e por área (dorso e ventre) (Ploton et al. 1986).

As medidas de espessura do epitélio da língua foram realizadas utilizando-se o software ImageJ[®], do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos, disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Teste do micronúcleo em células da medula óssea

Um nono grupo foi estabelecido como grupo controle positivo para o teste de micronúcleo na medula óssea: PC - Grupo Controle Positivo (machos: n=8): ciclofosfamida em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (MacGregor 1987).

A medula óssea de um dos fêmures foi utilizada para o teste do micronúcleo. As células da medula óssea foram coletadas dos fêmures em 3ml de soro fisiológico. Após ressuspensão, o material foi centrifugado por 5 minutos, a 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 0,5ml de soro fisiológico. Os esfregaços foram realizados por extensão de gotas desta suspensão em uma lâmina. Os esfregaços foram secos ao ar e posteriormente corados pelo corante de Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Foram preparadas duas lamínas com esfregaço por animal (MacGregor 1987).

Dois mil eritrócitos policromáticos por animal foram contados no aumento de 400x para determinação do número de micronúcleos (MacGregor 1987). Foram considerados micronúcleos as estruturas que apresentaram um halo circundante sugestivo de membrana, menores que um terço do diâmetro do núcleo associado, intensidade de coloração semelhante ao núcleo e mesmo plano focal a microscopia (Tolbert et al. 1992).

Análise estatística

Variáveis expressas como escores foram consideradas não paramétricas. As variáveis contínuas foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para validar o pressuposto de normalidade dos dados, pelo qual se observou ausência de normalidade. Variáveis não paramétricas foram comparadas entre sexos pelo teste

de Mann-Whitney e entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis com contraste pelo método de Dunn. Todas as análises foram conduzidas no Programa R, considerando-se 5% de nível de significância (R Development Core Team 2019).

Resultados

Uma fêmea do grupo OC foi a óbito durante o estudo devido à infecção do conduto auditivo.

Peso dos animais

O peso inicial e final dos animais não diferiu entre expostos e não expostos ($p = 0,29$) e entre vias de exposição ao glifosato ($p > 0,05$).

Ingestão da ração

A quantidade de ingesta da ração não diferiu entre grupos avaliados ($p = 0,703$).

Boca

Análise citopatológica

Não foram observadas células micronucleadas nos esfregaços bucais dos animais avaliados. Uma fêmea do grupo exposta à média concentração do glifosato por via oral apresentou células binucleadas (Figura 1).

Cariomegalia foi a alteração nuclear predominante nas fêmeas expostas ao glifosato ($p < 0,05$) (Figura 1). Detectou-se diferenças entre os grupos OM x (OL, OH) ($p = 0,0080$) e entre IL x (IC, IM, IH) ($p < 0,05$) (Figura 2).

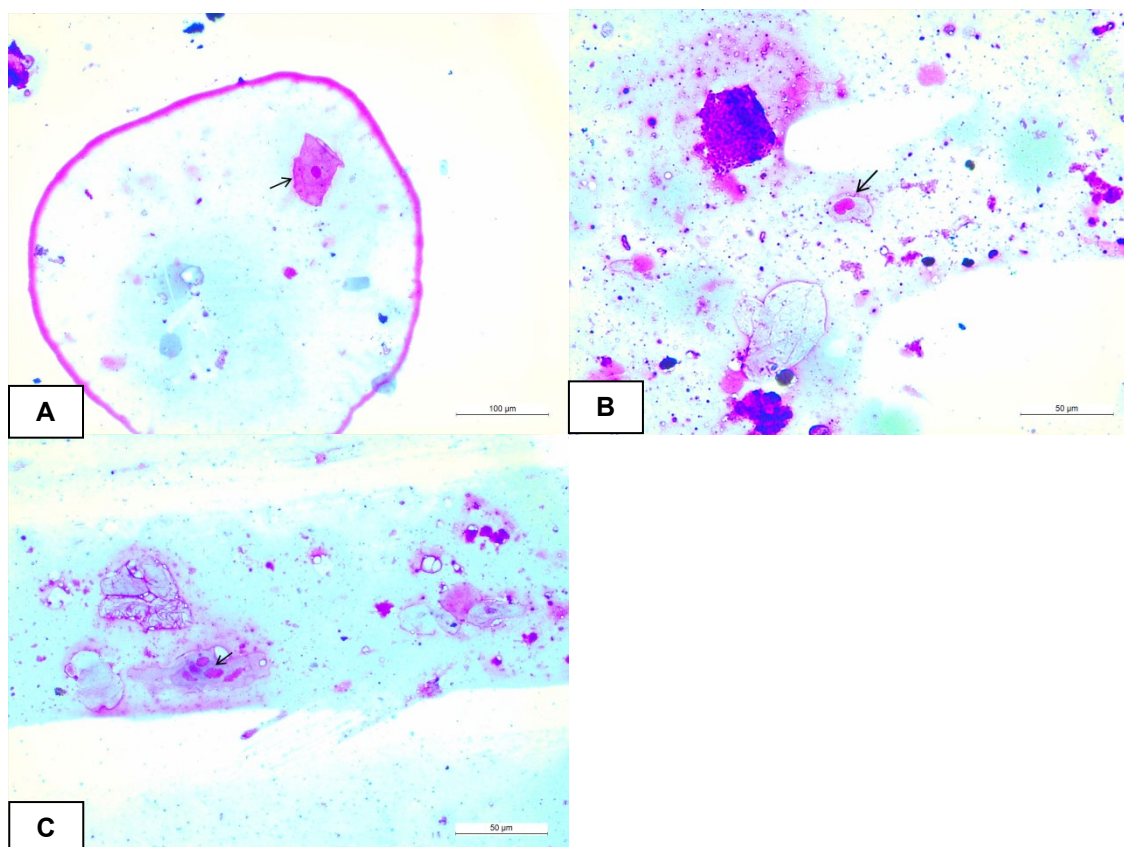


Figura 2 - Esfregaços citológicos da mucosa da língua. A - Célula escamosa normal (seta) (animal fêmea do grupo IC) (aumento de 200x). B – Célula binucleada (seta) (animal fêmea do grupo OM). C - Células com cariomegalia (seta) (animal fêmea do grupo OM). Coloração de Giemsa. Em A, aumento de 200x – barra de escala: 100 µm; em B e C: aumento de 400x – barra de escala: 50 µm.

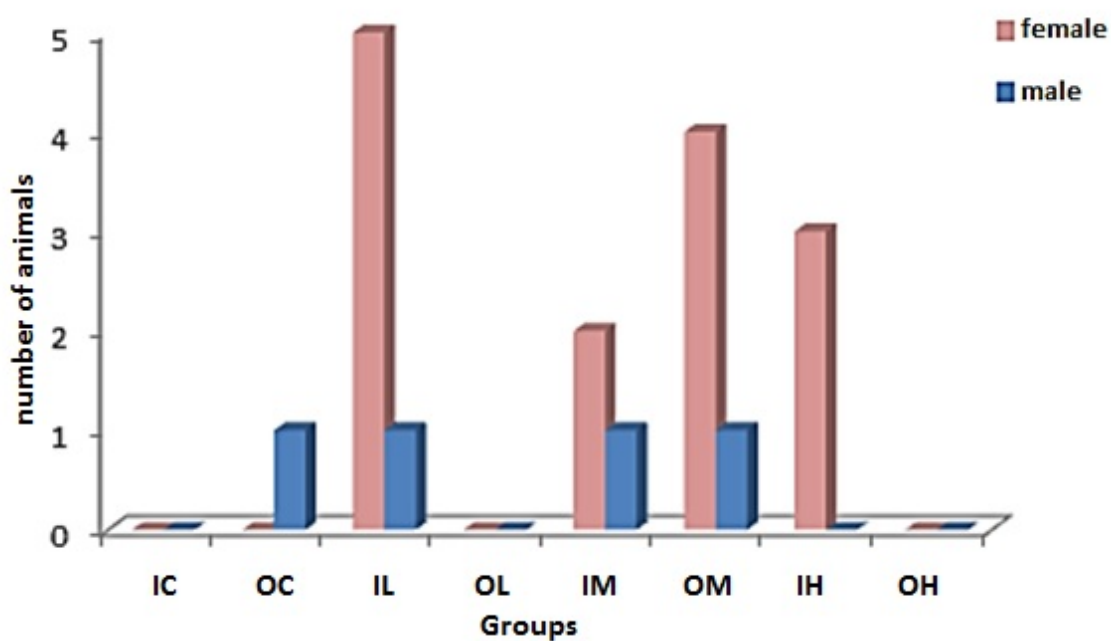


Figura 3 - Incidência de cariomegalia aos esfregaços bucais por grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato.

Análise histopatológica

No epitélio da língua não foram observadas hiperkeratose, parakeratose, lesões displásicas ou neoplásicas benignas ou malignas.

Nos animais que se observou congestão da mucosa da língua, esta foi de grau leve. Não houve diferença em relação ao sexo dos animais ($p=0,070$). Houve diferença entre o grupo IC x IH ($p= 0,016$) e o IM x (IL, IH) ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos expostos por via oral (Figuras 3 e 4A).

As fêmeas dos grupos expostos à baixa concentração de glifosato e os machos do grupo IM não apresentaram inflamação. Nos demais grupos, a inflamação foi leve e constituída por mononucleares (linfócitos), não havendo diferença entre sexos ($p >0,05$). O grupo IC diferiu dos grupos IL, IM, IH e OH dos grupos OC, OL, OM ($p<0,05$) (Figura 4).

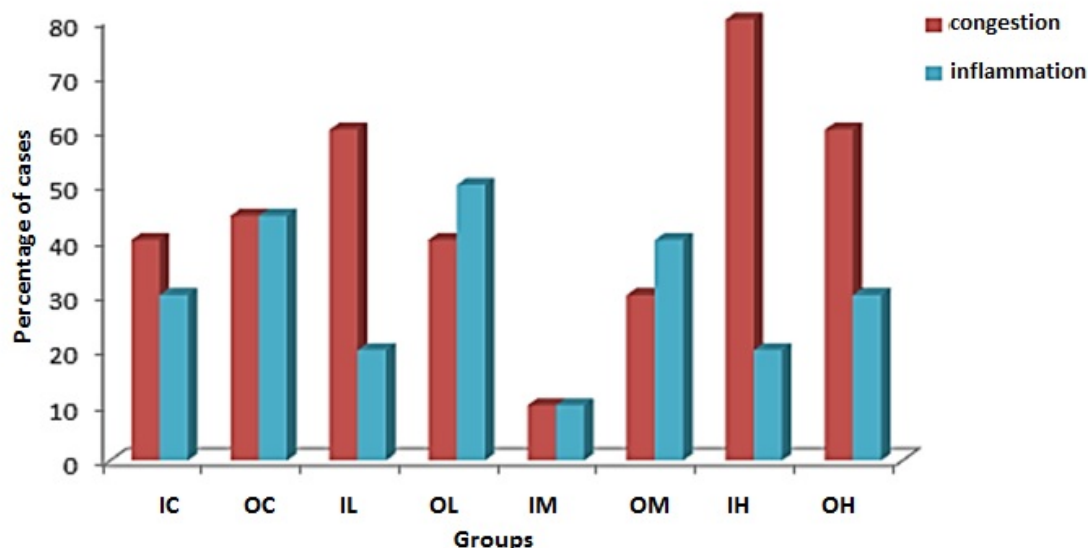


Figura 4 – Porcentagem de congestão e inflamação na língua por grupo de estudo, independente do sexo dos animais (n=79). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato.

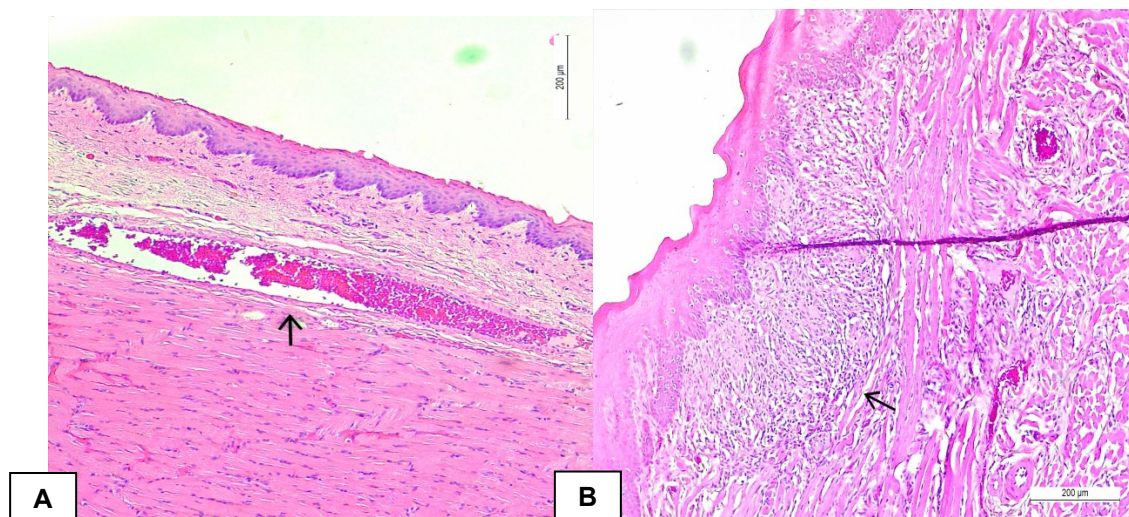


Figura 5 - Fotomicroscopia da mucosa da língua. A – Superfície ventral com congestão moderada do tecido. Observe o capilar dilatado e cheio de sangue (seta) (animal macho do grupo IL). B – Superfície dorsal com foco de inflamação da submucosa à custa de linfócitos (seta) (animal macho do grupo OL). Hematoxilina-eosina, aumento de 100x - barra de escala: 200 µm.

O número de mastócitos diferiu entre sexos ($p < 0,05$), sendo maior nas fêmeas. Os grupos expostos por via oral apresentaram número mais alto de mastócitos do que os expostos por via inalatória ($p = 0,016$) (Figura 5).

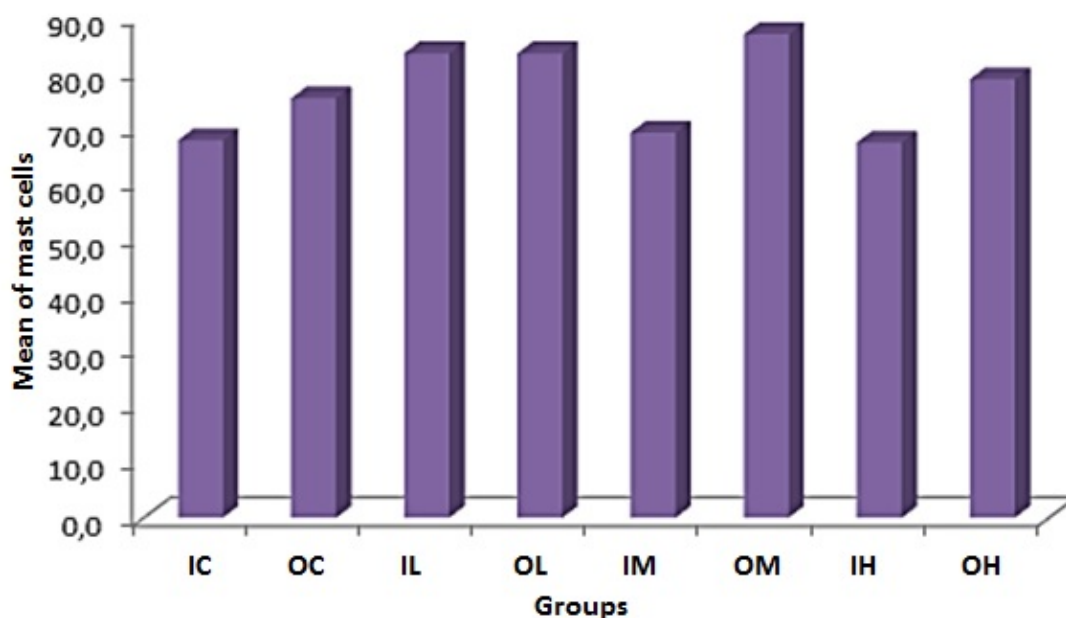


Figura 6 – Concentração de mastócitos (por mm^2) nos animais submetidos a diferentes concentrações de glifosato segundo a via de exposição (oral e inalatória) ($n=79$). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato.

Medida da espessura do epitélio da língua

Não houve diferença significativa da espessura do epitélio entre expostos ou não ao glifosato e entre sexos, tanto no dorso quanto no ventre ($p > 0,05$).

Contagem de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) na língua

A exposição ao glifosato elevou o número de NORs na via oral, porém esse aumento foi maior nas concentrações baixa e média e reduzida na alta concentração (Figura 6). Não houve diferença significativa na contagem de NORs entre sexos, tanto no dorso ($p = 0,778$) quanto no ventre da língua ($p = 0,308$).

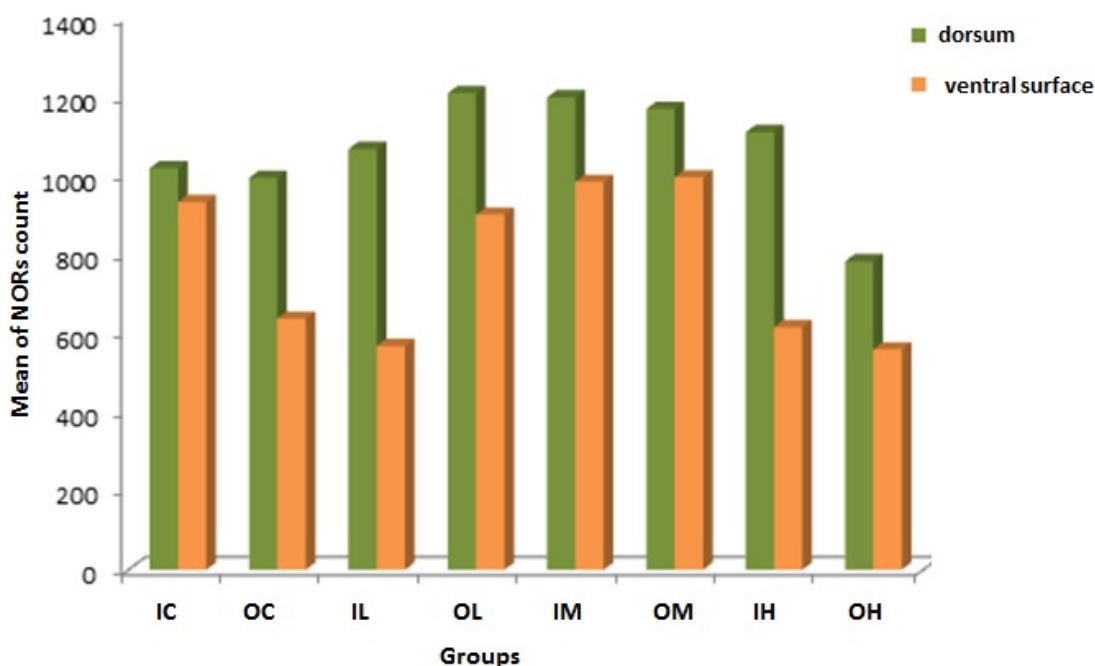


Figura 7 - Média do número de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) no epitélio do dorso e do ventre da língua por grupo de estudo independente do sexo dos animais ($n = 79$). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato.

Correlação entre a medida da espessura do epitélio e a contagem de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) na língua

Não houve correlação entre a medida da espessura do epitélio com a contagem de NORs tanto no dorso ($\rho = -0,229$; $p = 0,523$) quanto no ventre da língua ($\rho = -0,018$; $p = 0,959$) em nenhum dos grupos avaliados.

Esôfago

Não foram observadas congestão, inflamação, hiperkeratose, parakeratose ou lesões neoplásicas malignas ou benignas. Todos os animais expostos por via inalatória ao glifosato apresentaram displasia leve e todos os expostos por via oral ao glifosato apresentaram displasia moderada do epitélio ($p = 0.00001$), independente do sexo ($p = 0,371$) (Figura 8). Os animais dos grupos controle não apresentaram lesões displásicas do epitélio.

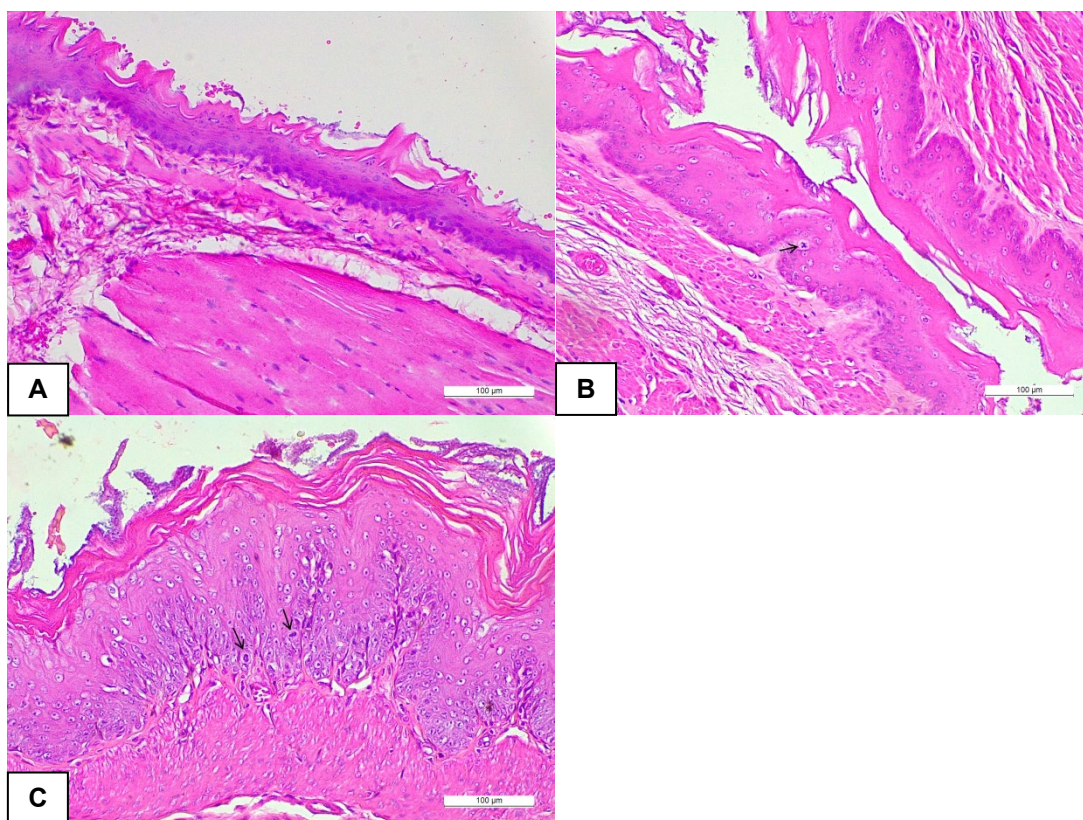


Figura 8 - Fotomicroscopia do esôfago. A – Epitélio esofágico normal (animal macho do grupo IC). B – Displasia leve do esôfago. Há discreto aumento da espessura do epitélio, núcleos volumosos e com nucléolos evidentes e figuras de mitose atípicas (seta) (animal macho do grupo IH). C – Displasia moderada do esôfago. Notar aumento acentuado da espessura do epitélio, núcleos volumosos e com nucléolos evidentes e figuras de mitose atípicas (setas) (animal macho do grupo OH). Hematoxilina-eosina, aumento de 200x - barra de escala: 100 µm.

Estômago

Não foram observadas alterações gástricas nos animais estudados.

Intestino delgado

Animais de todos os grupos apresentaram congestão leve da mucosa do intestino delgado. Não foram observadas alterações neoplásicas benignas ou malignas nos animais estudados.

Todos os animais expostos ao glifosato apresentaram processo inflamatório do tipo linfocitário na mucosa. Inflamação moderada foi observada em 60% dos animais dos grupos IL e OL, os demais animais apresentaram inflamação de grau leve. Não houve diferença entre sexos em relação ao parâmetro de inflamação ($p = 0,600$) (Tabela 2, Figura 9).

A maioria dos animais expostos ao glifosato, independente da via de exposição, apresentou hiperplasia linfóide ($p < 0,05$), não havendo diferença entre os sexos ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Em relação à displasia da mucosa, também não houve diferença entre o sexo dos animais ($p > 0,05$). Apenas os animais dos grupos expostos à média e alta concentração do glifosato apresentaram displasia, sendo que todos os animais do grupo OH apresentaram displasia moderada, enquanto os demais grupos apresentaram displasia leve ($p < 0,05$). O grupo IM foi o que apresentou frequência mais baixa de displasia entre os grupos que apresentaram esta alteração (Tabela 2, Figuras 8 e 9).

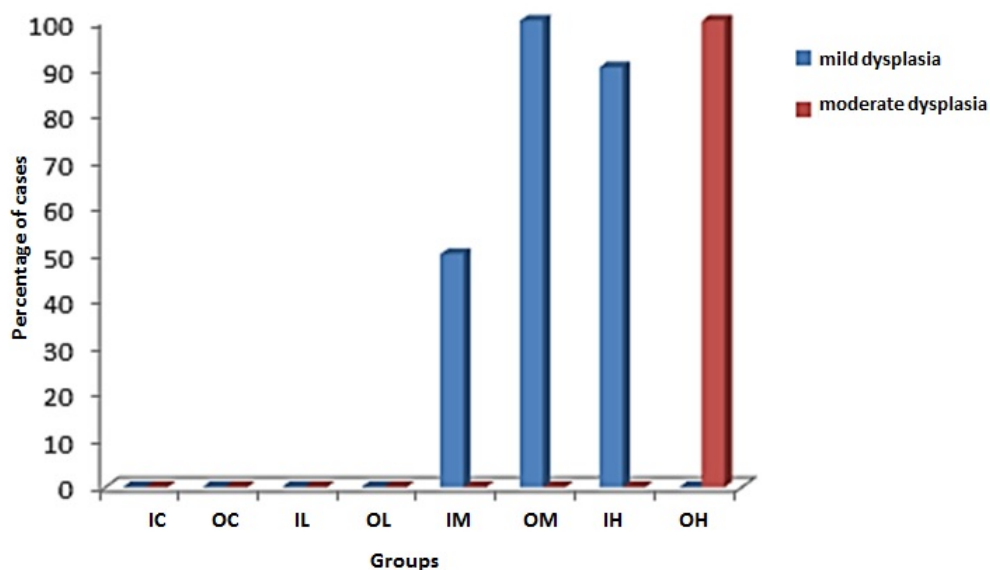


Figura 9 - Porcentagem de casos com displasia leve e moderada no intestino delgado por grupo de estudo (n=79). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média

concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato.

Tabela 1 - Incidência de inflamação, hiperplasia linfóide e displasia no epitélio do intestino delgado, segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79).

Grupos	Sexo	Inflamação		Hiperplasia linfóide	Displasia	
		Leve	Moderada		Leve	Moderada
IC	F	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	1/5 (20%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	3/5 (60%) ^b	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
OC	F	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a	2/4 (50%) ^b	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a
	M	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	1/5 (20%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
IL	F	0/5 (0%) ^a	4/5 (80%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	3/5 (60%) ^b	2/5 (40%) ^c	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
OL	F	3/5 (60%) ^b	2/5 (40%) ^c	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	1/5 (20%) ^a	4/5 (80%) ^b	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
IM	F	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	3/5 (60%) ^b	1/5 (20%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	4/5 (80%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a
OM	F	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a
	M	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a
IH	F	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	4/5 (80%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a
	M	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a
OH	F	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b
	M	5/5 (100%) ^c	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b

Grupos: IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato. F: fêmea; M: macho. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam $p < 0,05$, onde $a \neq b, c$; $b \neq a, c$; $c \neq a, b$.

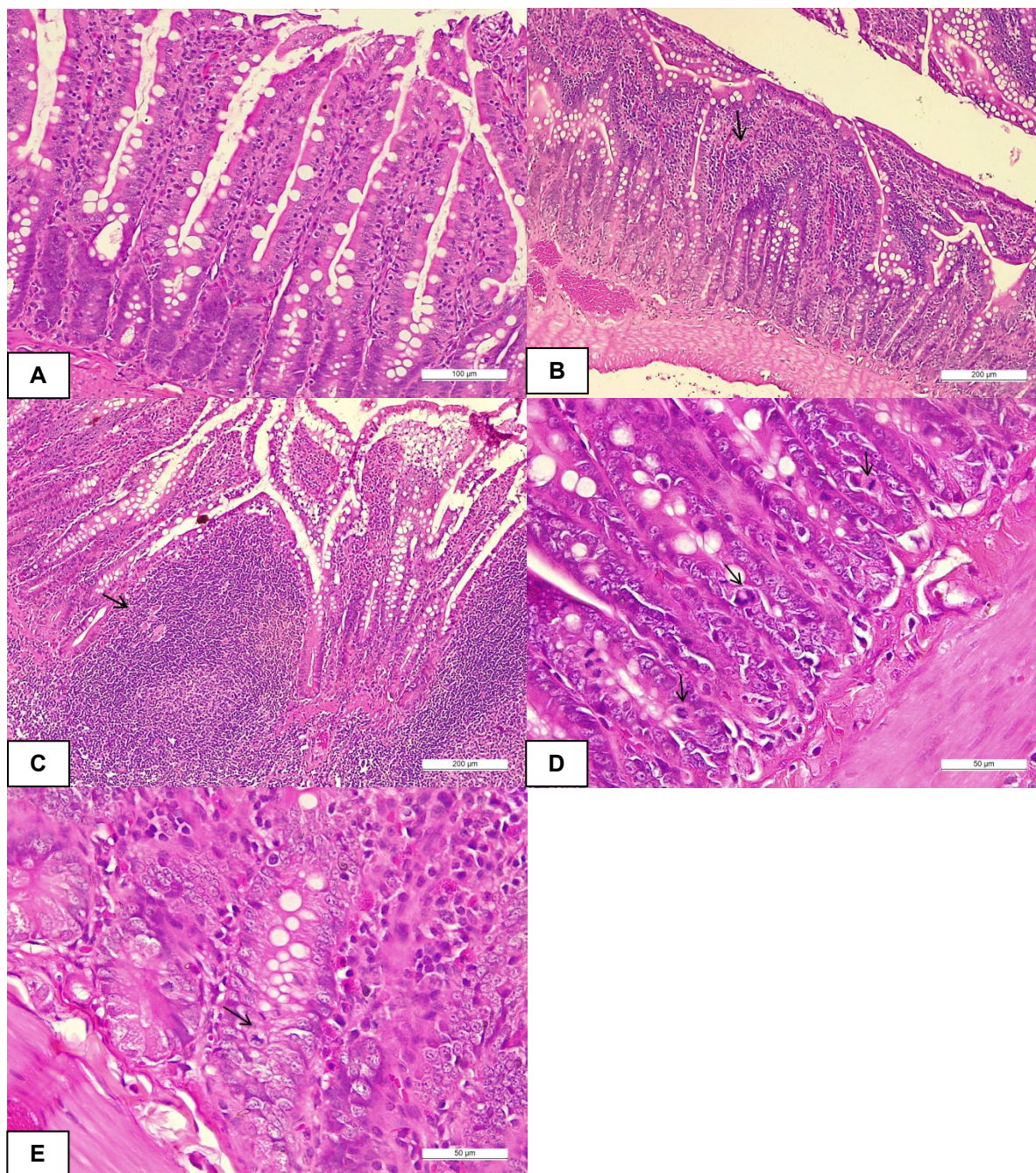


Figura 10 - Fotomicroscopia do intestino delgado. A – Mucosa intestinal normal (animal macho do grupo IC) (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x – barra de escala: 100µm). B – Mucosa intestinal com intenso processo inflamatório (animal macho do grupo IL) (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x – barra de escala: 200µm). C – Hiperplasia linfóide (seta) (animal macho do grupo IH) (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x – barra de escala: 200µm). D – Displasia leve da mucosa. Notar núcleos hipercromáticos e figuras de mitose (setas) (animal macho do grupo IM) (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x – barra de escala: 50µm). E – Displasia moderada da mucosa. Notar diminuição do número de células caliciformes, núcleos não polarizados e vesiculosos com nucléolos e figuras de mitose atípicas (seta). (animal macho do grupo OH) (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x – barra de escala: 50µm).

Intestino grosso

Animais de todos os grupos apresentaram congestão leve da mucosa do intestino grosso. Apenas uma fêmea do grupo OL, uma fêmea do grupo IM e três machos do grupo OM apresentaram hiperplasia linfoide. Não foram observadas alterações neoplásicas benignas ou malignas em nenhum animal.

A inflamação apresentada pelos animais foi de grau leve e à custa de infiltrado linfocitário (Figura 11). Para presença de inflamação, houve diferença significativa entre o grupo IC x (IM, IH), entre IL x (IM, IH), entre OC x (OM, OH) e entre OL x (OM, OH) ($p < 0,05$), porém não houve diferença entre os sexos ($p = 0,423$) (Tabela 3).

Todos os animais do grupo IM, OM, IH e OH apresentaram displasia, sendo moderada em um animal do grupo IH e em todos do grupo OH ($p < 0,05$) (Figuras 10 e 11). Não houve diferença entre os sexos para o parâmetro displasia ($p = 0,502$) (Tabela 3).

Tabela 2 - Incidência de inflamação e displasia no epitélio do intestino grosso, segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79).

Grupos	Sexo	Inflamação	Displasia	
			Leve	Moderada
IC	F	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
OC	F	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a
	M	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
IL	F	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
OL	F	1/5 (20%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
	M	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%) ^a
IM	F	5/5 (100%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a
	M	5/5 (100%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a
OM	F	5/5 (100%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a
	M	5/5 (100%) ^b	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a
IH	F	5/5 (100%) ^b	4/5 (80%) ^b	0/5 (0%) ^a
	M	5/5 (100%) ^b	4/5 (80%) ^b	1/5 (20%) ^a
OH	F	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b
	M	5/5 (100%) ^b	0/5 (0%) ^a	5/5 (100%) ^b

Grupos: IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato. F: fêmea; M: macho. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam $p < 0,05$, onde $a \neq b, c$; $b \neq a, c$; $c \neq a, b$.

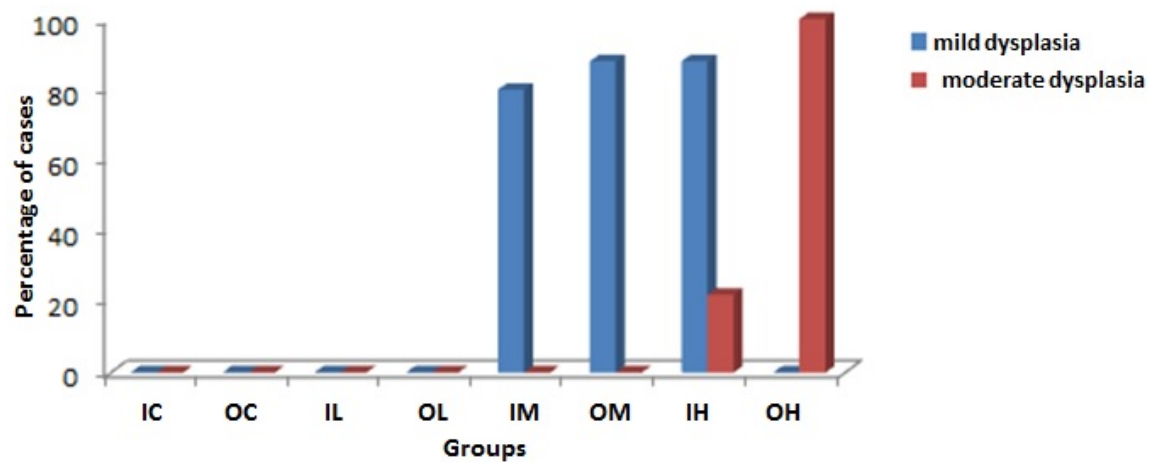


Figura 11 - Porcentagem de casos com displasia leve e moderada no intestino grosso por grupo de estudo (n=79). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato.

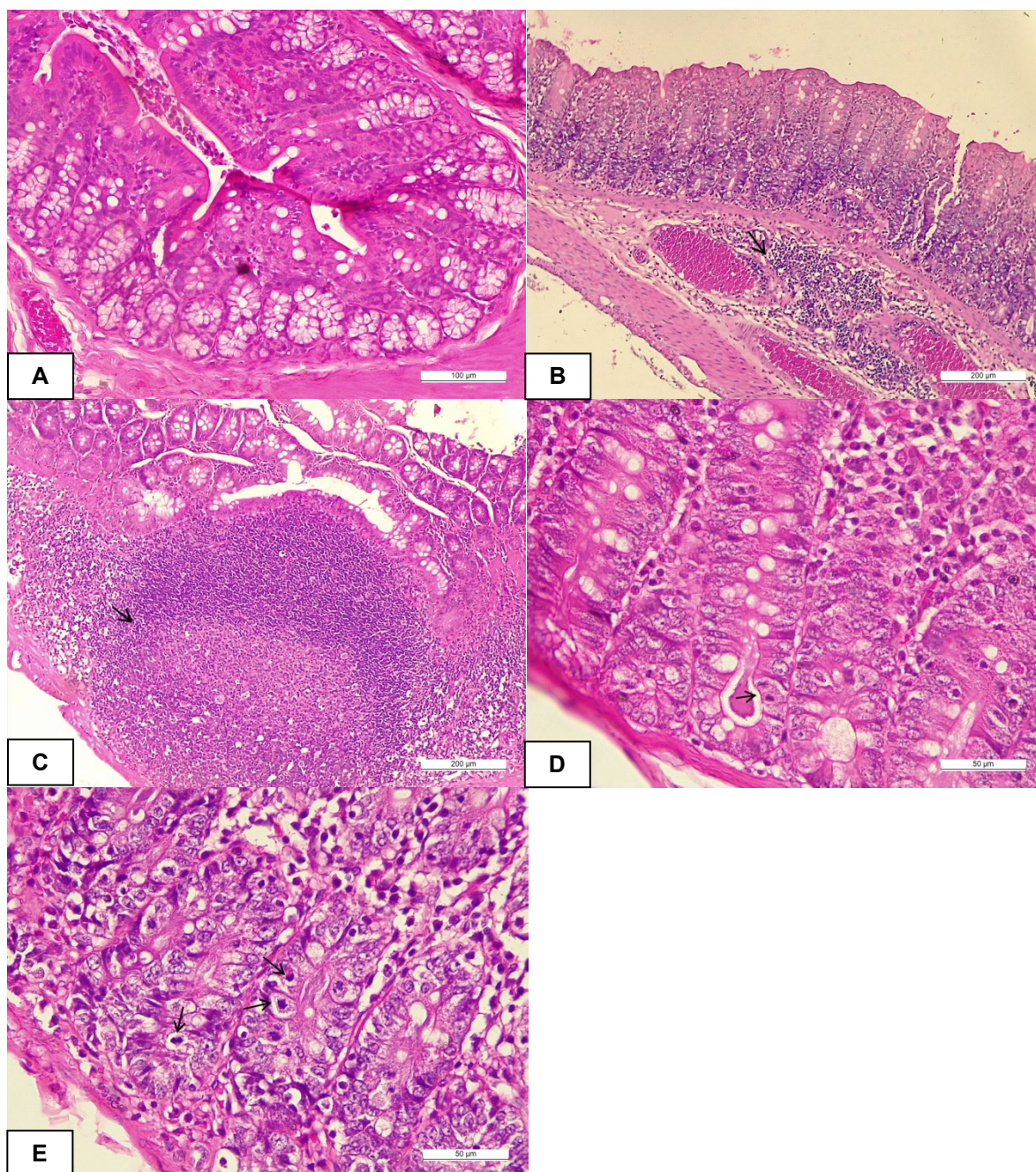


Figura 12 - Fotomicroscopia do intestino grosso. A – Mucosa intestinal normal (animal macho do grupo OC) (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x – barra de escala: 100µm). B – Mucosa intestinal com congestão vascular e infiltrado inflamatório leve (seta) (animal macho do grupo IM) (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x – barra de escala: 200µm). C – Hiperplasia linfoide (seta) (animal macho do grupo IH) (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x – barra de escala: 100µm). D – Displasia leve. Notar núcleos com perda de polaridade, cromatina irregular e nucléolos evidentes e figuras de mitose (seta) (animal macho do grupo OM) (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x – barra de escala: 50µm). E – Displasia moderada. Notar diminuição acentuada de células caliciformes, células com núcleos vesiculosos com cromatina irregular e nucléolos evidentes e várias figuras de mitose (setas) (animal fêmea do grupo OH) (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x – barra de escala: 50µm).

Teste do micronúcleo em células da medula óssea

Houve diferença entre sexos, com maior número de micronúcleos nas fêmeas expostas à baixa concentração por via oral de glifosato e número alto nos machos expostos a alta concentração inalatória deste agrotóxico ($p = 0,001$) (Figuras 12 e 13).

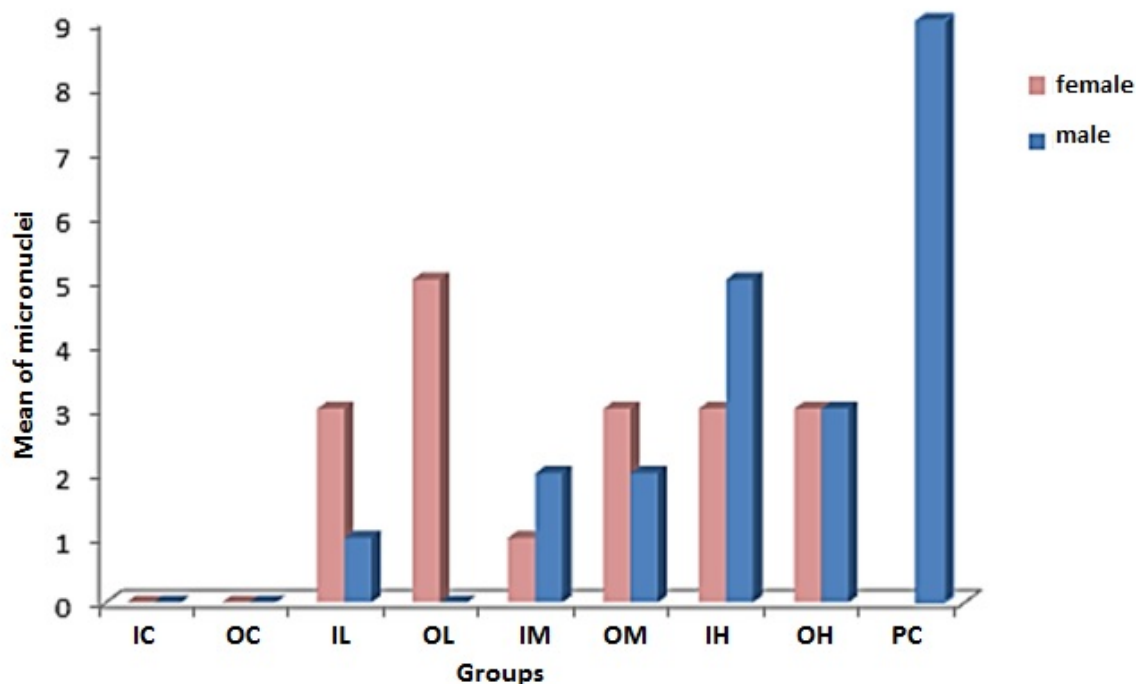


Figura 13 - Mediana de micronúcleos na medula óssea por grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). IC: Controle inalatório; OC: Controle oral; IL: Baixa concentração inalatório de glifosato; OL: Baixa concentração oral de glifosato; IM: Média concentração inalatório de glifosato; OM: Média concentração oral de glifosato; IH: Alta concentração inalatório de glifosato; OH: Alta concentração oral de glifosato; PC: Grupo controle positivo.

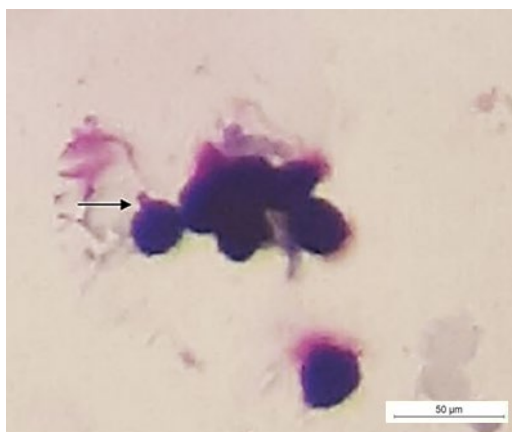


Figura 14 - Eritrócito policromático com micronúcleo (seta) (animal fêmea do grupo OL). Coloração de Giemsa, aumento de 400x – barra de escala: 50μm.

Discussão

Neste estudo, observou-se que congestão tecidual, inflamação e aumento do número de NORs, além de displasia do epitélio do esôfago e do intestino delgado e grosso nos animais expostos ao glifosato. Com exceção do aumento do número de mastócitos na língua e do número de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos da medula óssea, os demais parâmetros não foram influenciados pelo sexo dos animais. A mucosa gástrica não sofreu dano frente à exposição ao glifosato.

Foi observado em prévios estudos que os rins e TGI são os órgãos alvos do glifosato em ruminantes. No caso do trato digestório, foi observada irritação da mucosa ao exame histopatológico (EFSA 2015). Assim, neste estudo optamos por estudar o trato digestório e as possíveis implicações sobre este sistema orgânico tanto da exposição inalatória (mais comum na exposição ocupacional) quanto da exposição a alimentos contaminados pelo glifosato (via oral) (mais comum na exposição não ocupacional).

Há relatos de queimadura, erosão, ulceração e hemorragia da mucosa bucal em casos de exposição aguda acidental ao glifosato (Mui 1993; Sribanditmongkol et al. 2012; Deo e Shetty 2012). Em nosso estudo, observamos cariomegalia nos esfregaços citológicos, a qual é uma alteração reativa a uma agressão tecidual ou mesmo a um processo inflamatório duradouro. Porém, o grupo com maior número de casos com células cariomegalia foi o grupo exposto à baixa concentração por via inalatória, que apresentou maior intensidade de congestão e menor número de casos de inflamação. Isto demonstra uma agressão direta provocada pelo glifosato sobre o epitélio, mas provavelmente devido à baixa dosagem de exposição não observamos processo inflamatório. Entretanto, um maior número de casos com congestão e menor de inflamação também foi observado nos animais expostos a altas concentrações do glifosato (independente da via de exposição).

A congestão tecidual é a primeira alteração do processo inflamatório encontrada no tecido (Punchard 2004). Uma alta concentração de glifosato pode provocar tal agressão no tecido que estimule alteração vascular mais intensa do que recrutamento de células inflamatórias. Maior número de casos de inflamação ocorreu nos animais expostos à baixa e média concentração oral, mostrando que a via oral em doses menores, por contato direto do glifosato com a mucosa pode acarretar resposta inflamatória local.

Também observamos um maior número de mastócitos na mucosa bucal nas fêmeas e nos grupos expostos por via oral. Este dado mostra que o glifosato pode estimular reação alérgica bucal, principalmente no contato direto com esta e em fêmeas. Aumento de mastócitos ou de Imunoglobulina E também foi encontrado em outros estudos durante a exposição de animais a outros agrotóxicos, de forma sistêmica (Cushman e Street 1982; Yasunaga et al. 2015), para pele e trato respiratório (Fukuyama et al, 2009) e para cavidade bucal (Parizi et al. 2020).

O aumento do número de NORs na mucosa da língua observado nos grupos expostos ao glifosato demonstra que houve uma agressão ao epitélio bucal que estimulou proliferação celular para reparar uma possível destruição celular causada pelo glifosato. Porém, no grupo exposto a alta concentração oral houve uma diminuição do número de NORs em relação ao grupo controle. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que em alta concentração e por via oral ocorra um dano tão severo ao epitélio que impeça o estímulo a proliferação celular regenerativa. Embora tenhamos observado um aumento de NORs na maioria dos grupos expostos ao glifosato, isto não foi suficiente para aumentar a espessura do epitélio da língua. Este é outro dado que corrobora que o glifosato cause muita destruição celular, a ponto da proliferação celular não aumentar a espessura do epitélio.

Há relatos de casos em seres humanos de ocorrência de hemorragia da mucosa gástrica após ingestão deliberada de glifosato (Sribanditmongkol et al. 2012; Deo e Shetty 2012), porém outro estudo mostrou ulceração da mucosa esofágica, mas sem lesão gástrica em dois casos de ingestão incidental de glifosato (Chen et al. 2013). Os autores especulam que a ausência de lesão gástrica nestes casos pode ser devida ao tipo de epitélio, a presença de ácido ou muco ou outros fatores locais e consideraram o glifosato como um agente cáustico de média intensidade (Chen et al. 2013). Em nosso estudo não observamos nenhuma lesão do epitélio gástrico, possivelmente porque mesmo por via oral, as doses foram muito menores e foram ou inaladas ou ingeridas incorporadas a ração e não uma ingestão pura do glifosato e em grande quantidade como em outros estudos. Essa justificativa se aplica também à ausência de lesões esofágicas, tais como ausência de erosões, ulcerações e inflamações nos animais expostos.

Em um estudo *in vitro* com fibras musculares de jejuno de roedores, foi observada diminuição da atividade motora das fibras musculares do jejuno, mesmo quando o glifosato foi aplicado em concentrações muito baixas (Chlopecka et al.

2014). Após a ingestão incidental de glifosato por seres humanos, foi observada dilatação do intestino delgado (Sribanditmongkol et al. 2012; Deo e Shetty 2012). Em outro estudo com leitões desmamados, utilizando-se glifosato adicionado à água em várias concentrações, não foi detectada alteração da morfologia intestinal (Qiu et al. 2020).

Em um estudo com ratos Sprague-Dawley mostrou que a exposição a longo prazo ao glifosato na água de torneira é tóxica para o microbioma intestinal e que somente as fêmeas tratadas apresentaram disbiose (Lozano et al. 2018). A disbiose da microbiota intestinal está associada a uma série de condições clínicas, como doença inflamatória intestinal ou câncer colorretal (Cho e Blaser 2012). O fato de o glifosato causar disbiose intestinal pode justificar termos observado inflamação na mucosa intestinal dos animais expostos, embora não tenhamos observado diferença entre os sexos para este parâmetro, como outros estudos mostraram. A maior intensidade de inflamação e maior incidência de animais com hiperplasia linfóide no intestino delgado pode ocorrer pelo fato do glifosato ser encontrado em maior concentração no intestino delgado após a exposição oral (Chlopecka et al. 2014) e isto talvez ocorra também para a exposição inalatória, uma vez que não observamos diferenças entre as vias de exposição.

A carcinogenicidade do glifosato é controversa na literatura. Enquanto a Agência Internacional da Organização Mundial de Saúde para Pesquisa do Câncer (IARC) considera o glifosato como sendo "provavelmente cancerígeno para o homem" (categoria 2A) (IARC 2015) e alguns estudos com roedores tenham mostrado ocorrência de neoplasias benignas e malignas na tireoide, fígado, rim, pâncreas, testículos e glândula pituitária (Greim et al. 2015), outros estudos mostram que não há risco carcinogênico do glifosato após revisão do perfil toxicológico deste agrotóxico (Willians et al. 2016; Tarazona et al. 2017). A EFSA considerou que os estudos em humanos eram muito limitados para associar o glifosato a neoplasias (Portier et al. 2016).

A displasia epitelial é uma lesão pré-cancerígena, que dependendo da sua graduação tem uma menor chance (displasia leve) ou maior chance (displasia moderada e severa) de evoluir para um carcinoma. O nosso estudo é o primeiro a demonstrar que o glifosato tem potencial cancerígeno para esôfago e intestino delgado e grosso, principalmente em concentrações maiores e que a via de

exposição oral pode acarretar displasia moderada, a qual apresenta maior risco de evolução para carcinoma.

Embora o epitélio esofágico seja o mesmo da cavidade bucal, ambos são epitélios escamosos estratificados, só observamos displasia no esôfago. Isto pode ter ocorrido devido à lavagem mecânica que a saliva faz na cavidade bucal, permitindo um menor tempo de permanência do glifosato na boca.

Assim como a carcinogenicidade, a genotoxicidade do glifosato também é controversa na literatura. Alguns estudos mostraram que o glifosato não apresenta risco genotóxico significativo em condições normais de exposição humana ou ambiental (Heydens 2008; Kier e Kirkland 2013). Outros estudos mostraram que produtos contendo glifosato podem ser genotóxicos em répteis e mamíferos (Prasad et al. 2009; Lopez Gonzalez et al. 2013), aumento de escores de dano no DNA ao teste cometa em eritrócitos e células branquiais de peixes (Moreno et al. 2014) e de quebra de fitas de DNA (também observadas ao ensaio do cometa) em brânquias e células hepáticas de enguias expostos ao glifosato na água (Guilherme et al. 2011).

Além de aumento da incidência de aberração cromossômica e indução de micronúcleos dependente da dose e do tempo de exposição (1 a 3 dias) ao glifosato em mamíferos (Prasad et al. 2009). Esta variabilidade de resultados pode ocorrer devido a diferenças na pureza do agente ativo e da natureza dos componentes inertes testados que podem aumentar a toxicidade do agrotóxico (Prasad et al. 2009). Em nosso estudo, utilizamos a marca comercial mais usada mundialmente e não a forma pura do agrotóxico, pois não é em sua forma pura que ele é utilizado para pulverização das lavouras. Assim, observamos um aumento de micronúcleos nos grupos expostos ao glifosato, independente da via, em relação aos grupos controle. Este dado vem de encontro ao achado de displasia no esôfago e intestino delgado e grosso, mostrando que o glifosato tem potencial genotóxico e carcinogênico mediante exposição a doses relevantes da exposição humana.

O sexo pode influenciar a toxicidade dos xenobióticos, influenciando sua toxicocinética, toxicodinâmica e resultados. Estas diferenças entre os sexos frente aos xenobióticos podem ocorrer por diversos motivos: devido ao comportamento, exposição, anatomia, fisiologia, bioquímica e genética, o que pode alterar não só a resposta a produtos químicos ambientais, mas também as reações adversas a medicamentos (Gochfeld 2017). Em nosso estudo, pudemos observar diferenças entre os sexos somente em alguns parâmetros, como maior incidência de células

com cariomegalia e de mastócitos na cavidade bucal das fêmeas. Estes dados mostram que as fêmeas apresentam maior reatividade e mais risco de reação alérgica bucal quando expostas ao glifosato. Estudos mostram que homens e mulheres diferem em sua susceptibilidade ao desenvolvimento de distúrbios imunológicos e de alergia e na capacidade de combater infecções. As mulheres são mais susceptíveis ao desenvolvimento de alergias e doenças autoimunes por razões multifatoriais, que podem estar associadas a hormônios sexuais e complemento de cromossomo sexual (Laffont e Guéry 2019). Isto explica termos observado uma maior reatividade celular e maior número de mastócitos nas fêmeas expostas ao glifosato.

Também observamos que as fêmeas apresentaram maior número de micronúcleos quando expostas a baixa concentração oral de glifosato, enquanto os machos não apresentaram micronúcleos, porém em alta concentração por via inalatória, houve maior formação de micronúcleos nos machos. Isto pode implicar que baixas doses são suficientes para causar dano de DNA nas fêmeas e não nos machos e que altas doses podem levar a destruição das células, por isso não foi observada a formação de micronúcleos nas fêmeas. Outros testes de genotoxicidade deverão ser realizados para que se possam explicar melhor os diferentes efeitos de diferentes concentrações do glifosato para os sexos.

Conclusões

Com os dados do nosso estudo, mediante as condições de padrão e tempo de exposição realizadas, podemos concluir que o glifosato estimula processo inflamatório no trato digestório, pode provocar alergias bucais (principalmente nas fêmeas), lesões displásicas no esôfago e intestino delgado e grosso e tem potencial genotóxico, caracterizado pelo aumento de micronúcleos nos animais expostos. Em geral, a via oral provoca mais alterações no trato digestório que a via inalatória. Neste estudo sob exposição subcrônica o estômago é poupado em exposições subcrônicas a doses semelhantes à da exposição ambiental ao glifosato.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana

Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes. P. H. N. Chagas foi bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC / CNPq).

Conflito de interesses

Os autores declararam que não apresentam nenhum conflito de interesse.

Financiamento

Este estudo foi financiado com fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

Referências

Benbrook C (2016) Trends in the use of glyphosate herbicide in the U.S. and globally. *Environ Sci Eur* 28(1):3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.

Chen HH, Lin JL, Huang WH, Weng CH, Lee SY, Hsu CW, Chen KH, Wang IK, Liang CC, Chang CT, Yen TH (2013) Spectrum of corrosive esophageal injury after intentional paraquat or glyphosate-surfactant herbicide ingestion. *Int J Gen Med* 6:677-683. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S48273>.

Chłopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W (2014) Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses - in vitro study. *Pestic Biochem Physiol* 113:25-30. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.06.005>.

Cho I, Blaser MJ (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13: 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>

Conrad A, Schroter-Kermani C, Hoppe HW, Ruther M, Pieper S, Kolossa-Gehring M (2017) Glyphosate in German adults - time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health* 220(1):8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.016>.

Cushman JR, Street JC (1982) Allergic hypersensitivity to the herbicide 2,4-D in BALB/c mice. *J Toxicol Environ Health* 10(4-5):729–741.

Deo SP, Shetty P (2012) Accidental chemical burns of oral mucosa by herbicide. *JNMA J Nepal Med Assoc* 52(185):40-42.

EPA (1993) Re-registration Eligibility Decision (RED) Glyphosate: EPA-738-R-93-014. Washington: US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs and Toxic Substances.

European Food Safety Authority (2015) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. EFSA J 13(11):4302

Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T (2009) Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. Toxicol 261:152-61.

Gochfeld M (2017) Sex Differences in Human and Animal Toxicology. Toxicol Pathol 45(1):172-189. <https://doi.org/10.1177/0192623316677327>.

Greim H, Saltmiras D, Mostert V, Strupp C (2015) Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. Crit Rev Toxicol 45:185-208. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.1003423>

Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M (2012) DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutat Res 743(1-2):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>.

Heydens WF, Healy CE, Hotz KJ, Kier LD, Martens MA, Wilson AG, Farmer DR (2008) Genotoxic potential of glyphosate formulations: mode-of-action investigations. J Agric Food Chem. Feb 27;56(4):1517-23. <https://doi.org/10.1021/jf072581i>.

IARC Working Group (2015) Glyphosate. In: Some organophosphate insecticides and herbicides: diazinon, glyphosate, malathion, parathion, and tetrachlorvinphos. Vol 112 IARC Monogr Prog 1-92.

Kier LD, Kirkland DJ (2013) Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. Crit Rev Toxicol 43(4):283-315. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.770820>.

Laffont S, Guéry JC (2019) Deconstructing the sex bias in allergy and autoimmunity: From sex hormones and beyond. Adv Immunol 142:35-64. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2019.04.001>.

Landrigan PJ, Belpoggi F (2018) The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. *Environmental Health* 17:51. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0392-z>

Lopez Gonzalez EC, Latorre MA, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL (2013) Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup_ (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pestic Biochem Physiol* 105:131-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.12.009>.

Lozano VL, Defarge N, Rocque LM, Mesnage R, Hennequin D, Cassier R, de Vendômois JS, Panoff JM, Séralini GE, Amiel C (2017) Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. *Toxicol Rep* 5:96-107. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.005>.

MacGregor JT (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 189(2):103-112.

Martelli BKL, Melo DM, Nai GA, Parizi JLS (2014) Influence of water pH in oral changes caused by cadmium poisoning: an experimental study in rats. *Rev Odontol UNESP* 43(3): 1-5.

Mello FA, Quinallia G, Marion AL, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, Fagiani MAB, Mareco EA, Favareto APA, Rossi e Silva RC (2018) Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* 51(4). <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>

Moreno NC, Sofia SH, Martinez CB (2014) Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 37(1):448-454. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.012>.

Mui PC (1993) Endoscopic evaluation of paraquat-induced upper gastrointestinal injury. *Gastrointest Endosc* 39(1):105-106. [https://doi.org/10.1016/s0016-5107\(93\)70032-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5107(93)70032-2)

Nai GA, Filho MAG, Estrella MPS, Teixeira LDS (2015) Study of the influence of the ph of water in the initiation of digestive tract injury in cadmium poisoning in rats. *Toxicol Rep* 2:1033-1038. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.07.012>.

National Research Council (2011): *Guide for the care and use of laboratory animals, eighth edition*, The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/12910>

Parizi ACG, Barbosa RL, Parizi, JLS, Nai GA (2010) A comparison between the concentration of mast cells in squamous cell carcinomas of the skin and oral cavity. *An Bras Dermatol* 85(6):811-8.

Parizi JLS, Tolardo AJ, Lisboa ACG, Barravieira B, Mello FA, Rossi RC, Nai GA (2020) Evaluation of buccal damage associated with acute inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in mice. *BMC Vet Res* 16: 244. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02461-w>

Pegoraro CMR, Nai GA, Garcia LA, Serra FM, Alves JA, Chagas PHN, Oliveira DG, Zocoler MA (2018) Protective effects of *Bidens pilosa* on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by carbontetrachloride in rats. *Drug Chem Toxicol* 5:1-11. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1526182>.

Ploton D, Menager M, Jeannensson P, Himberg G, Pigeon F, Adnet JJ (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. *Histochem J* 18:5-14.

Portier CJ, Armstrong BK, Baguley BC, Baur X, Belyaev I, Bellé R, Belpoggi F, Biggeri A, Bosland MC, Bruzzi P, Budnik LT, Bugge MD, Burns K, Calaf GM, Carpenter DO, Carpenter HM, López-Carrillo L, Clapp R, Cocco P, Consonni D, Comba P, Craft E, Dalvie MA, Davis D, Demers PA, De Roos AJ, DeWitt J, Forastiere F, Freedman JH, Fritschi L, Gaus C, Gohlke JM, Goldberg M, Greiser E, Hansen J, Hardell L, Hauptmann M, Huang W, Huff J, James MO, Jameson CW, Kortenkamp A, Kopp-Schneider A, Kromhout H, Larramendy ML, Landrigan PJ, Lash LH, Leszczynski D, Lynch CF, Magnani C, Mandrioli D, Martin FL, Merler E, Michelozzi P, Miligi L, Miller AB, Mirabelli D, Mirer FE, Naidoo S, Perry MJ, Petronio MG, Pirastu R, Portier RJ, Ramos KS, Robertson LW, Rodriguez T, Rössli M, Ross MK, Roy D, Rusyn I, Saldiva P, Sass J, Savolainen K, Scheepers PT, Sergi C, Silbergeld EK, Smith MT, Stewart BW, Sutton P, Tateo F, Terracini B, Thielmann HW, Thomas DB, Vainio H, Vena JE, Vineis P, Weiderpass E, Weisenburger DD, Woodruff TJ, Yorifuji T, Yu IJ, Zambon P, Zeeb H, Zhou SF (2016) Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). *J Epidemiol Community Health* 70(8):741-745. <https://doi.org/10.1136/jech-2015-207005>.

Prasad S, Srivastava S, Singh M, Shukla Y (2009) Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of Swiss albino mice. *J Toxicol* 2009: 1–6. <http://dx.doi.org/10.1155/2009/308985>.

Punchard NA, Whelan CIJ, Adcock I (2004) The Journal of Inflammation. Editorial. *J Inflamm* 1: 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-1-1>

Qiu S, Fu H, Zhou R, Yang Z, Bai G, Shi B (2020) Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. *Ecotoxicol Environ Saf* 187:109846. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109846>.

R Development Core Team (2019) R Software: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna. <http://www.r-project.org>. Accessed 19 March 2020.

Souza A D, Medeiros ADR, Souza ACD, Wink MR, Siqueira IR, Ferreira MBC, & Torres ILDS (2011) Avaliação do impacto da exposição a agrotóxicos sobre a saúde de população rural: Vale do Taquari (RS, Brasil). *Ciência & saúde coletiva* 16(8), 3519-3528. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000900020>

Sribanditmongkol P, Jutavijittum P, Pongraveevongsa P, Wunnapak K, Durongkadech P (2012) Pathological and toxicological findings in glyphosate-surfactant herbicide fatality: a case report. *Am J Forensic Med Pathol* 33(3):234-237.

Tarazona JV, Court-Marques D, Tiramani M, Reich H, Pfeil R, Istace F, Crivellente F (2017) Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol* 91(8):2723-2743. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-5>.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 271:69-77.

Williams GM, Berry C, Burns M, de Camargo JLV, Greim H (2016) Glyphosate rodent carcinogenicity bioassay expert panel review. *Crit Rev Toxicol* 46(sup1):44-55. doi: 10.1080/10408444.2016.1214679.

Yasunaga S, Nishi K, Nishimoto S, Sugahara T (2015) Methoxychlor enhances degranulation of murine mast cells by regulating Fc ϵ RI-mediated signal transduction. *J Immunotoxicol* 12:283–9. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.962122>.

2 ARTIGO 2

HEPATO E NEFROTOXICIDADE CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A CONCENTRAÇÕES RELEVANTES DA EXPOSIÇÃO HUMANA AO AGROTÓXICO GLIFOSATO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Título resumido: **GLIFOSATO E HEPATO E NEFROTOXICIDADE**

Fernanda de Maria Serra¹, Letícia Rocha Magalhães², Beatriz Bertholace Magalhães Silva², Emmanuela Beatriz Vantini Barreiro², Isabela Benes Franco², Isabela Melo Nogueira², Liliane Aparecida Tanus Benatti³, Gisele Alborghetti Nai^{1,2,4,*}.

¹Graduate Program in Animal Science, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

²Medical College, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

³Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁴Department of Pathology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

*Correspondence: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

RESUMO

O Roundup®, um herbicida a base de glifosato, tem em sua composição o 1-4 dioxano, responsável por câncer em animais e potencial causador de danos no fígado e aos rins de seres humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a hepato e nefrotoxicidade a exposição subcrônica ao agrotóxico glifosato em ratos mediante simulação de exposição ambiental. Foram utilizados 80 ratos Wistar albinos divididos em 8 grupos (5 machos e 5 fêmeas por grupo) - 4 grupos exposição inalatória, 4 grupos exposição oral: Grupos controle - nebulização com solução de cloreto de sódio; Grupos expostos ao glifosato - Baixa concentração [$3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha)]; Média concentração ($6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha); Alta concentração ($9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha). Os animais foram expostos por 75 dias. Coletou-se sangue para dosagem de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanino aminotransferase), creatinina e ureia e fígado, rim, pâncreas e baço para análise histopatológica. As fêmeas do grupo exposto à alta concentração oral apresentaram as maiores concentrações de AST, ALT e ureia ($p < 0,05$). Esteatose hepática foi observada em todos os animais expostos à média e alta concentração de glifosato ($p < 0,05$). Todos os expostos ao glifosato apresentaram alteração tubular. Necrose tubular foi mais incidente nos animais do grupo exposto a alta concentração oral. A contagem de NORs (regiões organizadoras de nucléolos), no fígado e no rim, foi maior nos animais expostos a altas concentrações de glifosato ($p < 0,05$). Nós concluímos que exposição a altas concentrações de glifosato causa maior dano hepático e renal, principalmente por via oral.

Palavras-chave: agrotóxico; hepatotoxicidade; nefrotoxicidade; exposição por inalação; exposição dietética.

Introdução

Nas últimas décadas, o mundo passou pelo advento da modernização, com avanços na tecnologia para produção em largas escalas. Isso refletiu na agricultura, levando a uso intenso de agrotóxicos.²³ Os agrotóxicos são utilizados por produtores de gado, indústrias alimentares, higiene pessoal e no uso doméstico, com o objetivo de combater ervas daninhas,² porém podem causar diversas consequências para os seres vivos.¹⁴

O glifosato é um agrotóxico organofosfato, sistêmico e não seletivo usado para matar várias espécies de gramíneas, folhosas e juncos.²⁶ Agrotóxico à base de glifosato são os principais pesticidas usados em todo o mundo, sendo atualmente aplicados em cerca de 24% do total de terras agrícolas do mundo todo,²⁷ principalmente em culturas de arroz, milho, soja, horticultura, viticultura e silvicultura.²⁸ Além disso, os agrotóxicos a base de glifosato são muito usados em jardins domésticos e urbanos, como praças e parques.^{16,27,28}

Resíduos de agrotóxicos à base de glifosato são comumente detectados em alimentos, na água potável contaminada pela chuva, escoamento superficial e lixiviação para as águas subterrâneas, aumentando assim as vias de exposição para a população em geral, não só para agricultores.^{16,27} Além disso, há evidências que sugerem que o glifosato e seus metabólitos estão muito disseminados na população.¹⁶

Agência de Proteção Ambiental dos EUA (*Environmental Protection Agency of United States* - USEPA) classifica o glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), na categoria IV de toxicidade (toxicidade aguda muito baixa em uso habitual).^{26,32} Assim como, o fabricante de glifosato apresenta este como não acarretando riscos à saúde humana e ao meio ambiente quando usado de acordo com as instruções do rótulo.²⁶

Estudos realizados com animais de laboratório e de fazenda mostram que os níveis de glifosato e de AMPA, são de 10 a 100 vezes maiores em tecidos renais e hepáticos do que em outros tecidos.⁸ Um estudo com animais de fazenda mostrou níveis urinários elevados de glifosato correlacionados com alterações nos parâmetros indicativos de estresse oxidativo hepático e renal.¹³ Isto mostra que o fígado e o rim são órgãos alvo da ação do glifosato.

Olorunsogo et al.¹⁹ foram os primeiros a descrever os possíveis efeitos hepáticos do glifosato. Vários estudos mostraram que o glifosato e suas formulações comerciais podem provocar efeitos tóxicos, principalmente em fígado e rim,¹⁷ porém estes estudos foram realizados com doses mais elevadas e por vias que não são as habituais a exposição humana.

O objetivo deste estudo foi avaliar a hepato e nefrotoxicidade a exposição subcrônica ao agrotóxico glifosato em ratos mediante simulação de exposição ambiental, analisando possíveis diferenças entre as principais vias de exposição humana (inalatória e oral) e diferenças entre os sexos.

Materiais e Métodos

Protocolo animal

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Instituição proponente (Protocolo nº 3792) (Anexo A). Os animais utilizados na pesquisa foram tratados de acordo com as diretrizes institucionais e com os princípios internacionalmente aceitos para uso e cuidados com animais de laboratório, com a devida consideração ao alívio de sofrimento e desconforto.

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos e fêmeas, adultos, com peso entre 200-250g, alocados em gaiolas plásticas, separados por sexo, em biotério climatizado com controle de temperatura e umidade, com ciclos de 12 horas de claro e escuro.

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (machos: n=5/grupo; fêmeas: n=5/grupo). Seis grupos foram expostos a três diferentes concentrações do glifosato, conforme descritas na bula do produto. Cada dose foi ajustada para a área da caixa, para simular a exposição ambiental (ocupacional e de alimentos) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de estudo avaliados.

Grupos	Concentração da exposição	Exposição inalatória	Exposição oral
Controle	Cloreto de sódio (NaCl)	G1	G2
Baixa concentração de glifosato	$3,71 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha* (correspondendo a 187,17 mg/m ³)	G3	G4
Média concentração de glifosato	$6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a 313,31 mg/m ³)	G5	G6
Alta concentração de glifosato	$9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a 467,93 mg/m ³)	G7	G8

* g.i.a/ha: gramas de ingrediente ativo por hectare.

Protocolo de exposição ao agrotóxico glifosato

A exposição ao agrotóxico glifosato foi feita com Glifosato [N-(phosphonomethyl) glycine] (Roundup Original DI, Monsanto, São Paulo, Brasil), com a seguinte composição: Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO): 445 g/L (44,5% m/v); Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO): 370 g/L (37,0% m/v); Outros Ingredientes: 751 g/L (75,1% m/v).

Para a nebulização foram utilizadas duas caixas (32x 24x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star® (Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil). Para todas as nebulizações, foi utilizado 10mL de cloreto de sódio (NaCl) como veículo. O tempo de exposição (dos animais e da ração) foi de aproximadamente 15 minutos, para que toda solução fosse nebulizada.¹⁵

Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados durante cinco dias seguidos na semana, simulando a exposição ocupacional. Os animais expostos por via oral tiveram a ração nebulizada um dia antes de ser consumida (Figura 1).³ A ração dos animais de todos os grupos foi trocada a cada dois dias e o residual pesado a cada troca. Os animais foram pesados no início e no final do experimento.

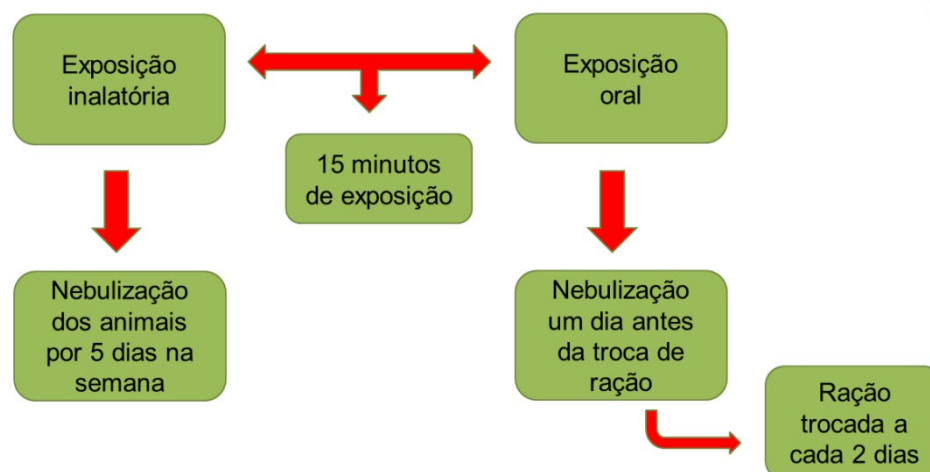


Figura 1 - Delineamento da nebulização dos animais e da ração.

A anestesia e a eutanásia foram feitas com Tiopental sódico (Syntec, EUA), nas doses de 40mg/Kg e 100 mg/Kg de peso, respectivamente, administrado na cavidade peritoneal.²⁰

Análise bioquímica

A coleta de sangue foi realizada por punção intracardíaca com vacutainer (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, EUA) após a anestesia dos animais. Foram coletados 5mL de sangue para realização dos seguintes exames laboratoriais: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), creatinina e ureia. Toda bioquímica sérica foi realizada em aparelho automatizado (COBAS C111, Roche, EUA).

Análise histopatológica

Após a eutanásia, foi retirado o fígado, rim, pâncreas e baço de cada animal. Os fragmentos retirados foram fixados em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes seriados de 5µ foram obtidos por micrótomo

LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

A análise histopatológica foi cega, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão). Os parâmetros gerais avaliados no fígado, rim, pâncreas e baço foram: infiltrado inflamatório intersticial (discreto, leve, moderado, severo) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou mononucleares); congestão tecidual (leve, moderada, intensa); necrose tecidual (focal, difusa); necrose vascular; lesões displásicas (displasia leve, displasia moderada, displasia grave) e presença de lesões neoplásicas benignas e malignas.²²

Também foram analisados especificamente em cada órgão, os seguintes parâmetros:²²

- Fígado: presença e tipo de esteatose (microvesicular e/ou macrovesicular), colestase, fibrose tecidual e cirrose;
- Rim: alteração tubular (degeneração hidrópica, necrose tubular); lesão glomerular; espessamento de membrana basal de vasos; e cilindros;
- Pâncreas: fibrose tecidual; atrofia acinar; e lesão das ilhotas de Langerhans.
- Baço: hiperplasia da polpa branca; hiperplasia da polpa vermelha; e fibrose tecidual.

Os cortes de fígado também foram corados pela coloração de Perls (Merck, Darmstadt, Alemanha) para identificação dos graus histológicos de armazenamento de ferro em hepatócitos, espaços sinusoidais e espaço portal segundo Deugnier e Turlin.⁵

Coloração de AgNOR

Os cortes desparafinizados de fígado e rim ficaram incubados em solução de nitrato de prata ao abrigo de luz em câmara úmida durante 40 minutos a 60°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água deionizada a 45°C e os cortes foram contracolorados com Van Gieson (“verde luz”) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 3 minutos.²⁴

A contagem das NORs (regiões organizadoras de nucléolos) foi realizada considerando-se 10 células/campo de grande aumento, repetindo-se em 10 campos microscópicos aleatórios, totalizando a contagem em 100 células (hepatócitos e células tubulares renais) em cada animal.²⁴

Análise estatística

Variáveis expressas como escores foram consideradas não paramétricas. As variáveis contínuas foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para validar o pressuposto de normalidade dos dados, pelo qual se observou ausência de normalidade. Variáveis não paramétricas foram comparadas entre sexos pelo teste de Mann-Whitney e entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis com contraste pelo método de Dunn. Todas as análises foram conduzidas no Programa R, considerando-se 5% de nível de significância.²⁵

Resultados

Uma fêmea do grupo G2 foi a óbito durante o estudo devido à infecção do conduto auditivo.

Peso dos animais e ingestão da ração

O peso inicial e final dos animais diferiu entre os sexos ($p = 0,007$), sendo menor nas fêmeas em todos os grupos (expostos e não expostos ao glifosato). Não houve diferença entre os grupos expostos e não expostos ($p = 0,29$) e entre as vias de exposição ao glifosato (oral e inalatória) ($p > 0,05$). Assim como, a quantidade de ingesta da ração não diferiu entre grupos avaliados ($p = 0,703$) e entre os sexos ($p > 0,05$).

Análise bioquímica e histopatológica dos órgãos

Fígado

Os machos do grupo G3 e as fêmeas dos grupos G5 e G8 apresentaram as maiores concentrações séricas de AST ($p = 0,015$) (Figura 2A). Os grupos G7 e G8 apresentaram as maiores concentrações séricas de ALT ($p = 0,02$), e estas concentrações foram maiores nos animais do sexo feminino ($p = 0,05$) (Figura 2B) (Tabela 2).

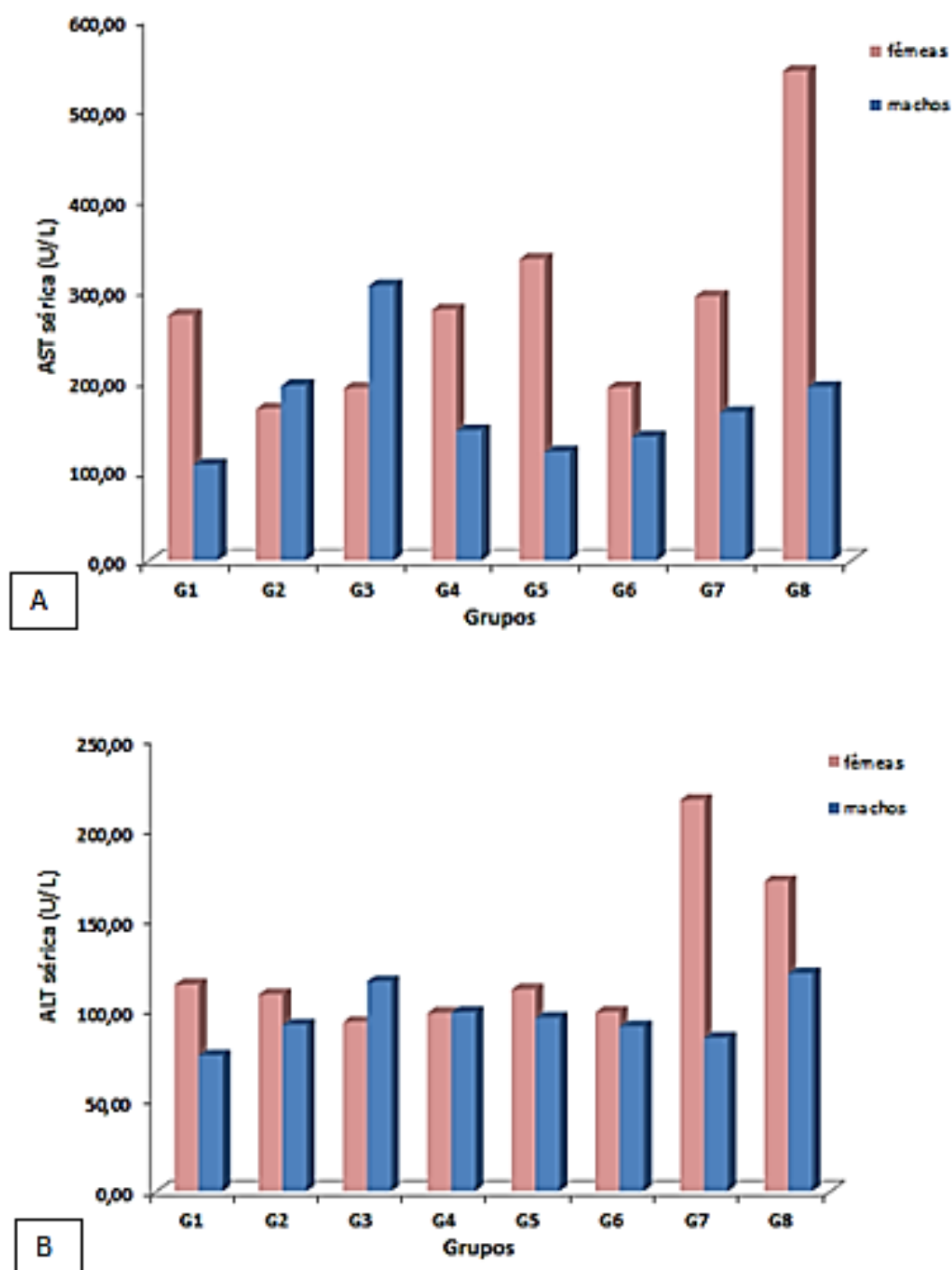


Figura 2 - Média concentração sérica por grupo estudado e segundo o sexo dos animais (n=79). A – AST (aspartato aminotransferase) (U/L). B – ALT (alanina aminotransferase) (U/L). Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral.

Tabela 2 - Média ($\pm$ desvio padrão) da concentração sérica de ALT (U/L), AST (U/L), creatinina (mg/dL) e ureia (mg/dL) por grupo de estudo, independente do sexo dos animais (n=79).

Grupos	AST	ALT	Creatinina	Ureia
G1	188,97($\pm$ 125,03) ^a	94,67($\pm$ 34,40) ^a	0,33($\pm$ 0,05) ^a	46,05 ($\pm$ 6,71) ^a
G2	182,37($\pm$ 88,77) ^a	99,57($\pm$ 32,26) ^a	0,33($\pm$ 0,07) ^a	46,68 ($\pm$ 8,47) ^a
G3	248,03($\pm$ 201,38) ^b	104,94($\pm$ 52,14) ^a	0,32($\pm$ 0,06) ^a	46,38 ($\pm$ 6,53) ^a
G4	210,87($\pm$ 95,77) ^a	98,82($\pm$ 6,72) ^a	0,32($\pm$ 0,04) ^a	52,72 ($\pm$ 7,09) ^{a,b}
G5	227,03($\pm$ 194,72) ^b	105,16($\pm$ 39,35) ^a	0,34($\pm$ 0,05) ^a	47,73 ($\pm$ 6,00) ^a
G6	164,14($\pm$ 49,95) ^a	95,19($\pm$ 15,82) ^a	0,30($\pm$ 0,04) ^a	53,02 ($\pm$ 6,38) ^{a,b}
G7	228,54($\pm$ 97,02) ^b	150,59($\pm$ 133,70) ^b	0,35($\pm$ 0,05) ^a	43,43 ($\pm$ 6,83) ^a
G8	367,47($\pm$ 233,56) ^c	146,06($\pm$ 54,01) ^b	0,40($\pm$ 0,09) ^b	59,00 ($\pm$ 8,10) ^b

Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral. F: fêmea; M: macho. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam $p < 0,05$, onde $a \neq b, c$; $b \neq a, c$; $c \neq a, b$.

Não foram observados fibrose tecidual, colestase, cirrose hepática, necrose tecidual, necrose vascular, lesões displásicas ou neoplásicas e depósitos de ferro.

Inflamação discreta, caracterizada por infiltração linfocitária focal, foi observada apenas em um animal fêmea do grupo G5 e dois animais machos do grupo G7 ($p > 0,05$).

Esteatose hepática, predominantemente difusa, foi observada em todos os animais expostos à média e alta concentração de glifosato, independente da via de exposição e sexo dos animais, e em 80% dos animais do grupo G3, onde houve predomínio nos machos ($p < 0,05$) (Figuras 3 e 4).

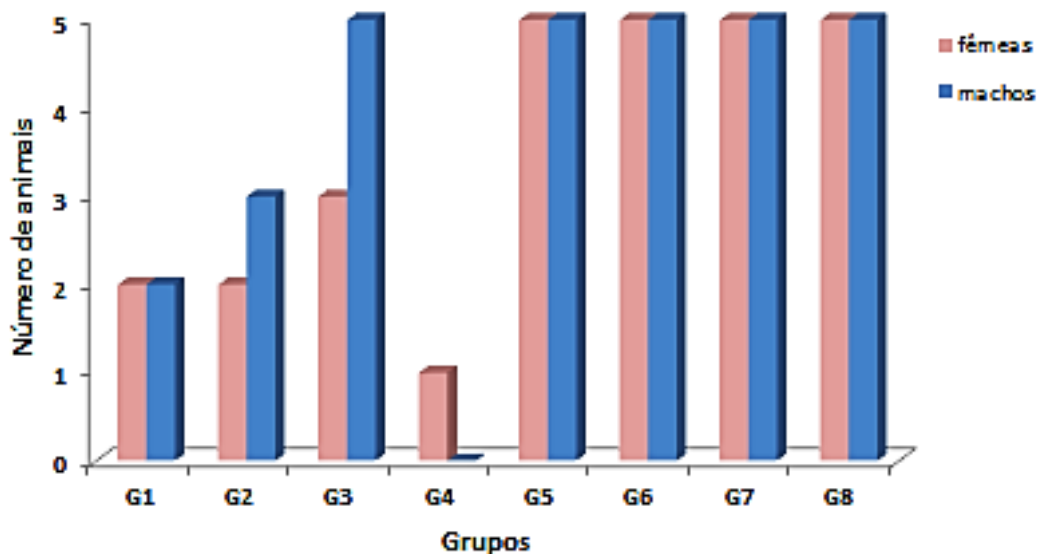


Figura 3 - Incidência de esteatose hepática por grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral.

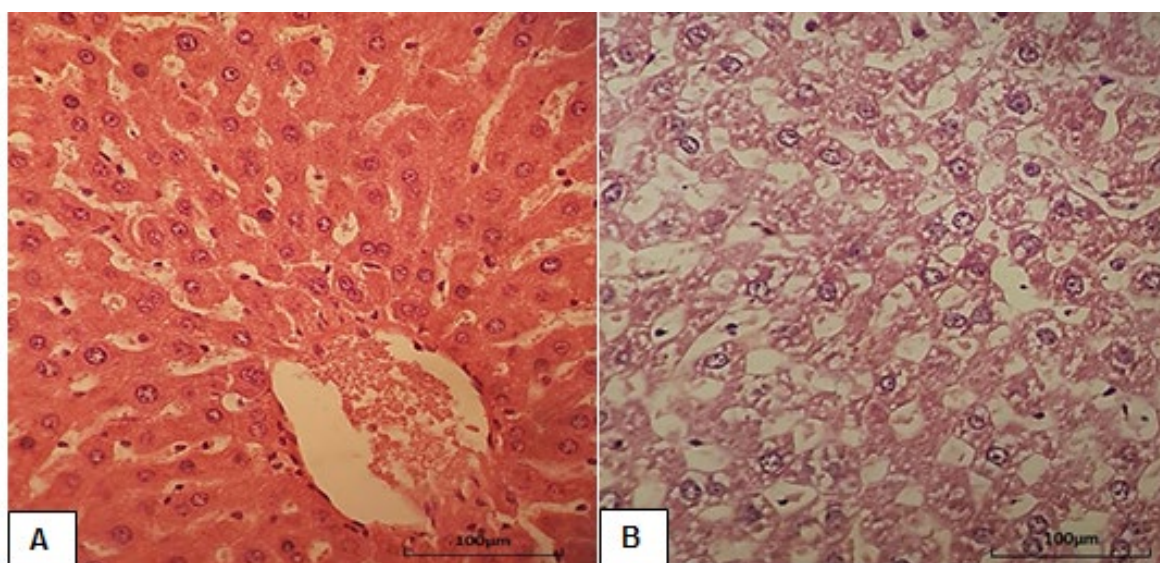


Figura 4 - Fotomicroscopia do fígado. A – Parênquima hepático normal (animal macho do grupo G1). B – Esteatose hepática. Notar microvacualização do citoplasma dos hepatócitos (animal macho do grupo G5). Hematoxilina-eosina, aumento de 400x. Barra de escala: 100 µm.

Quanto maior a concentração do agrotóxico maior foi a contagem de NORs nos hepatócitos ($p < 0,05$) (Tabela 3), assim como a via oral esteve associada a um

maior número de NORs do que a via inalatória ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os sexos na contagem de NORs ($p = 0,3465$) (Figura 5).

Tabela 3 - Média ($\pm$ desvio padrão) do número de NORs (regiões organizadoras de nucléolos) nos hepatócitos por grupo de estudo, independente do sexo dos animais (n=79).

Grupos	Número de NORs	Grupos	Número de NORs
G1	202,7 ($\pm 15,24$) ^{Aa}	G2	234,0 ($\pm 7,82$) ^{Aa}
G3	285,1 ($\pm 16,36$) ^{Ab}	G4	380,1 ($\pm 34,10$) ^{Bb}
G5	507,1 ($\pm 41,12$) ^{Ac}	G6	642,4 ($\pm 35,09$) ^{Bc}
G7	911,6 ($\pm 69,05$) ^{Ad}	G8	1159,0 ($\pm 58,01$) ^{Bd}

Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral. Letras maiúsculas comparam grupos na mesma linha. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam $p < 0,05$, onde A $\neq$ B; a $\neq$ b, c, d; b $\neq$ a, c, d; c $\neq$ a, b, d; e d $\neq$ a, b, c.

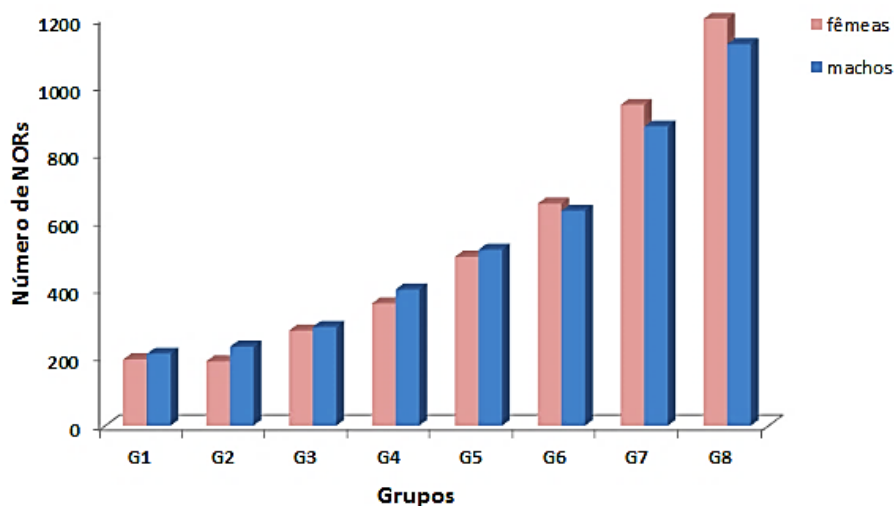


Figura 5 - Contagem de NORs (regiões organizadoras de nucléolos) nos hepatócitos por grupo de estudo e segundo o sexo dos animais (p=79). Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatória; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral.

Rim

A dosagem de creatinina não diferiu entre os sexos ($p = 0,177$). Na dosagem de ureia, as fêmeas apresentaram maior concentração do que os machos ($p = 0,01255$) (Figura 6). Os grupos expostos por via inalatória não apresentaram diferença na dosagem de creatinina ($p = 0,47$) e de ureia ($p = 0,524$). Os grupos expostos por via oral apresentaram diferença na dosagem de creatinina entre G8 x (G2, G4, G6) ($p = 0,02$) e na dosagem de ureia entre G2 e G8 ($p = 0,0119$) (Tabela 2).

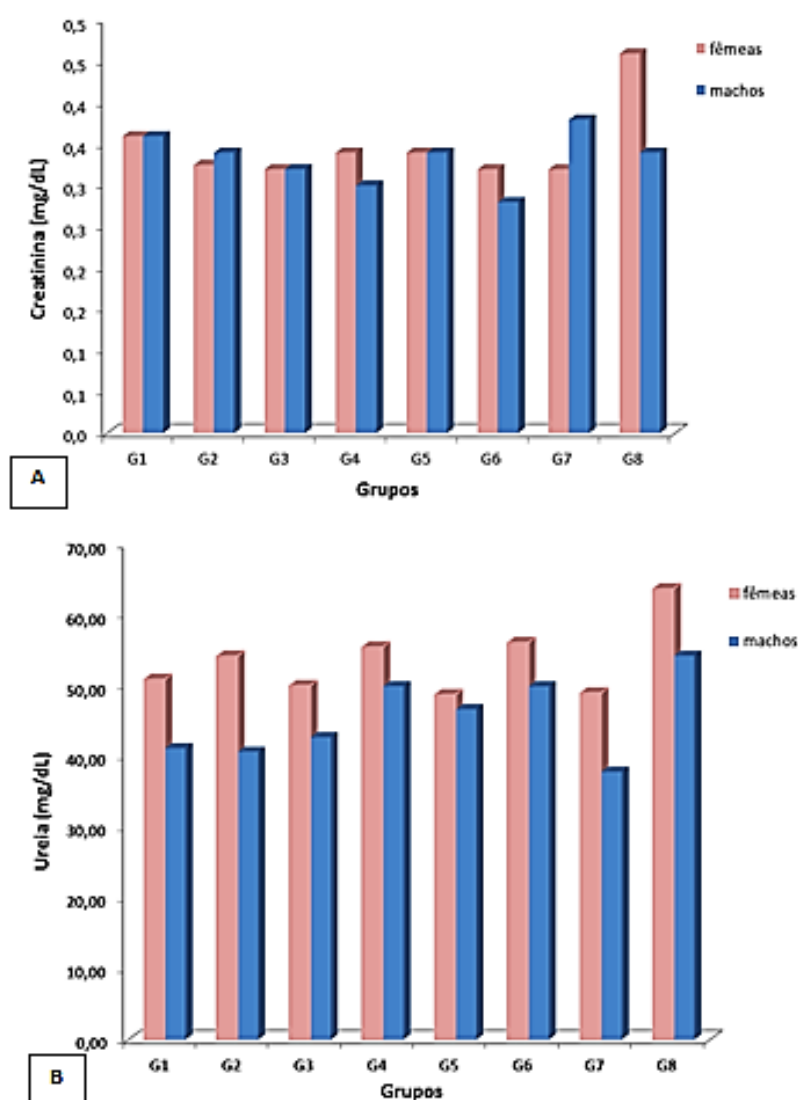


Figura 6 - Média da concentração sérica por grupo de estudo e segundo o sexo dos animais ($n=79$): A – Creatinina (mg/dL). B – Ureia (mg/dL). Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral.

Não se observou necrose tecidual, necrose vascular, lesão glomerular, espessamento de membrana basal de vasos e presença de cilindros.

A maioria dos animais expostos ao glifosato apresentou alteração tubular, predominantemente do tipo degeneração hidrópica, enquanto os animais dos grupos controle não apresentaram alteração ($p < 0,05$). A maior incidência de necrose tubular ocorreu nos animais do grupo G8 (30% dos casos) ($p < 0,05$) (Figuras 7 e 8). Não houve diferença entre o sexo dos animais em relação à incidência de alteração tubular ($p = 0,05$).

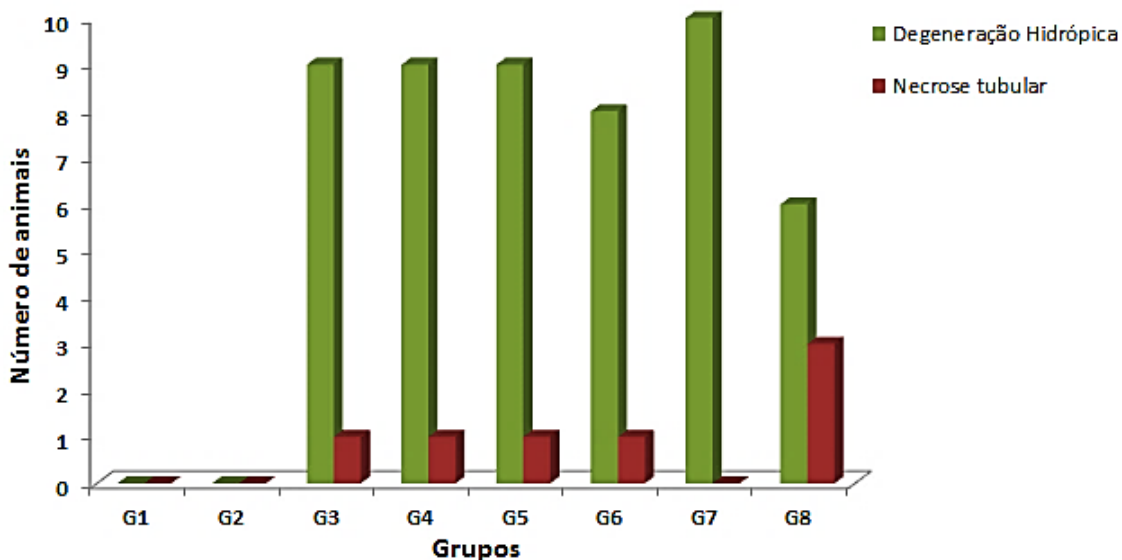


Figura 7 - Número de animais apresentando alteração tubular (degeneração hidrópica e necrose tubular) por grupo de estudo (n=79). Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral.

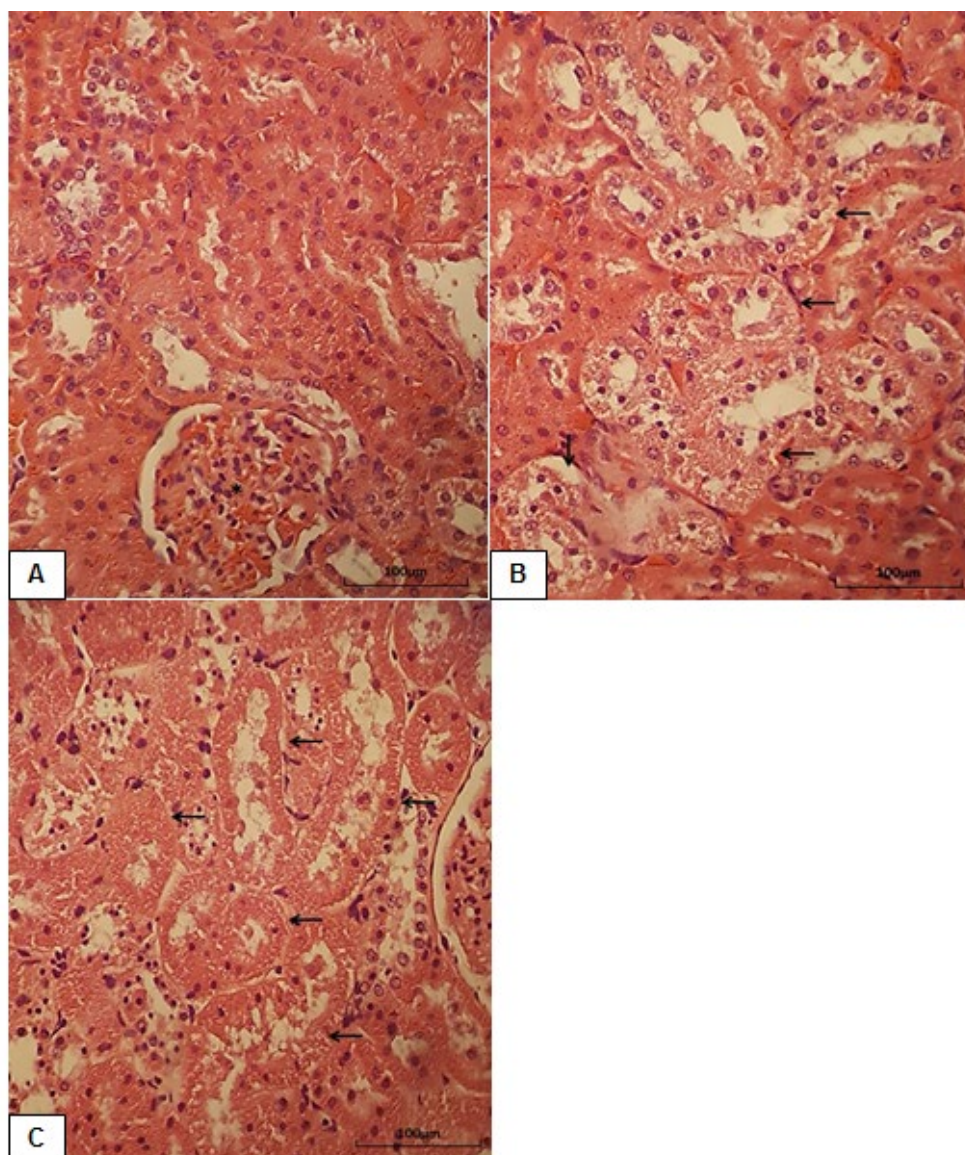


Figura 8 - Fotomicroscopia do rim. A – Parênquima renal com túbulos e glomérulos (asterisco) normais (animal fêmea do grupo G1). B – Degeneração hidrópica tubular renal. Notar citoplasma vacuolizado dos túbulos renais (setas) (animal fêmea do grupo G3). C – Necrose tubular aguda. Notar ausência de núcleos em alguns túbulos e fragmentação nuclear em outros (setas) (animal fêmea do grupo G4). Hematoxilina-eosina, aumento de 400x. Barra de escala: 100 µm.

Os grupos expostos à média e alta concentração de glifosato apresentaram as maiores contagens de NORs ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os sexos ($p = 0,4407$) e em relação à via de exposição na contagem de NORs ($p > 0,05$) (Tabela 4, Figura 9).

Tabela 4 - Média ($\pm$ desvio padrão) do número de NORs (regiões organizadoras de nucléolos) nos túbulos renais por grupo de estudo, independente do sexo dos animais (n=79).

Grupos	Número de NORs	Grupos	Número de NORs
G1	145,5 ($\pm$ 20,98) ^{Aa}	G2	143,1($\pm$ 13,73) ^{Aa}
G3	187,7 ($\pm$ 26,03) ^{Ab}	G4	216,3 ($\pm$ 13,14) ^{Ab}
G5	227,4 ($\pm$ 16,67) ^{Ac}	G6	196,5 ($\pm$ 6,55) ^{Ac}
G7	235,2 ($\pm$ 8,40) ^{Ac}	G8	255,6 ($\pm$ 16,65) ^{Ad}

Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral. Letras maiúsculas comparam grupos na mesma linha. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam $p < 0,05$, onde $A \neq B$; $a \neq b, c, d$; $b \neq a, c, d$; $c \neq a, b, d$; e $d \neq a, b, c$.

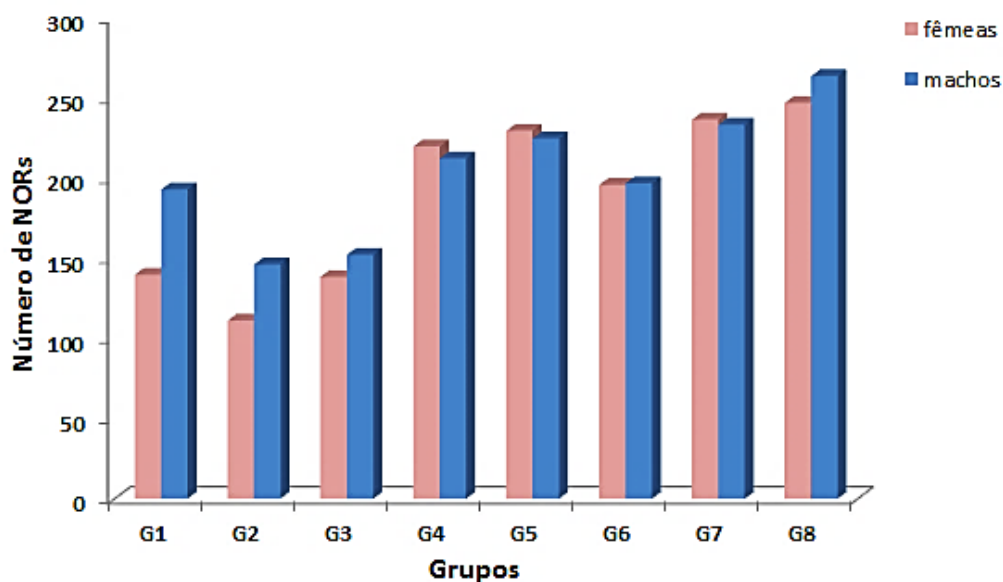


Figura 9 - Contagem de NORs (regiões organizadoras de nucléolos) nos túbulos renais por grupo de estudo e segundo o sexo dos animais (p=79). Grupos: G1: controle inalatório; G2: controle oral; G3: baixa concentração inalatório; G4: baixa concentração oral; G5: média concentração inalatório; G6: média concentração oral; G7: alta concentração inalatório; G8: alta concentração oral.

Pâncreas e baço

Não foram observadas alterações no pâncreas e no baço de nenhum dos animais estudados.

Discussão

No presente estudo, observamos aumento nos níveis de AST e ALT nos animais expostos ao glifosato, principalmente em fêmeas e naqueles expostos a alta concentração por via oral, além de esteatose em todos os expostos a média e alta concentração. As fêmeas expostas à alta concentração por via oral apresentaram os maiores níveis de ureia, e necrose tubular renal foi mais incidente nestes animais também. A contagem de NORs no fígado e no rim foi maior nos animais expostos à média e alta concentração de glifosato, sendo que no fígado a contagem foi maior nos grupos expostos por via oral.

Um estudo com ratos Sprague-Dawley tratados oralmente com diferentes doses de glifosato mostrou diminuição de peso, de ganho de peso e da média de ganho de peso diário após 35 dias de exposição.²⁷ Em nosso estudo, não houve alteração de peso ou de ingesta de ração quando comparado grupos expostos e não expostos ao glifosato. Possivelmente, o fato de termos utilizado doses menores de glifosato quando comparado a estudos anteriores e não ter utilizado gavagem (uma via não habitual de exposição humana) para administração do glifosato contribuiu para que não tenha ocorrido diminuição de peso ou de ingesta pelos animais.

Em um estudo com peixes expostos a doses subletais de glifosato por um ou dois dias na água, mostrou moderada degeneração de hepatócitos e fibrose hepática.²⁸ Em outro estudo com exposição de 35 dias de ratos por via oral ao glifosato, foi observado um aumento de AST e ALT, além de apoptose de alguns hepatócitos, necrose focal e infiltração de células mononucleares, mais acentuada nos animais expostos a dosagens mais altas de glifosato e associada a aumento no nível de Interleucina (IL)-1b, um marcador pró-inflamatório.²⁷ Outro estudo, também, com ratos, mas expostos ao glifosato na água de beber, mostrou ruptura nucleolar nos hepatócitos e aumento significativo da área celular e citoplasmática à microscopia eletrônica.¹⁶ Num caso descrito de tentativa de suicídio de uma mulher jovem com ingestão de 500mL de uma formulação concentrada de Roundup (um agrotóxico a base de glifosato), observou-se congestão acentuada dos sinusóides

hepáticos e esteatose leve microvesicular e macrovesicular na região centrolobular.²⁶ No presente estudo, houve aumento das concentrações séricas de AST nos grupos G3, G5 e G8; enquanto as concentrações de ALT foram maiores nos grupos expostos à média e alta concentração de glifosato. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear hepático foi descrito em alguns estudos, porém nós observamos apenas em três animais expostos ao glifosato, possivelmente por termos utilizados concentrações menores que as utilizadas anteriormente, o que justifica também não termos observado necrose tecidual ou vascular. Embora não tenhamos observado processo inflamatório na maioria dos animais expostos, houve um aumento progressivo na contagem de NORs, com o aumento da dose de exposição ao glifosato, sendo mais observado na exposição pela via oral. As NORs, regiões organizadoras de nucléolos, são marcadores de proliferação celular.²² Estes dados mostram que independente do estímulo de processo inflamatório, tivemos destruição hepatócitos e tentativa de regeneração nos animais expostos. Isto justifica termos observado aumento nos níveis de ALT e AST principalmente nos grupos expostos a maiores concentrações de glifosato.

Neste estudo, observamos esteatose hepática do tipo microvesicular (a qual está associada à exposição à grande parte dos agentes químicos) na maioria dos animais expostos a baixa concentração inalatória e a média e alta concentração oral e inalatória. Esteatose é um acúmulo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos por alteração do metabolismo lipídico.⁹ Condições lipotóxicas e estresse oxidativo e alterações metabólicas associadas a marcadores de hepatotoxicidade foram observadas em um estudo experimental com ratos.¹⁸ Nosso achado de esteatose hepática, junto ao de outro estudo que mostrou aumento de níveis séricos de triglicerídeos em animais expostos ao glifosato,¹⁶ mostra que este agrotóxico pode alterar o metabolismo hepático de lipídeos. Além disso, nosso estudo corrobora os dados de outros estudos, onde doses/concentrações mais elevadas de glifosato, mesmo quando utilizadas conforme descrito na bula do produto, causam mais dano hepático.

Os agrotóxicos têm sido aventados como possíveis causadores de doença renal crônica de origem multifatorial, principalmente na presença de outros fatores, como flúor, desnutrição e desidratação crônicas,³¹ assim como o glifosato tem sido associado à nefropatia agrícola em algumas regiões agriculturáveis do mundo.¹⁰ Estudos com exposição de ratos ao glifosato descreveram alterações nos

parâmetros bioquímicos e urinários, como perda de íons e diminuição da creatinina urinária, os quais são sugestivos de comprometimento da função renal,¹⁶ assim como aumento significativo de células necróticas e apoptóticas principalmente no epitélio tubular, necrose tubular e toxicidade glomerular, associados a níveis elevados de creatinina e a exposição a doses mais elevadas.^{27,32} Em um caso de intoxicação aguda por alta dose de glifosato em uma mulher jovem, os rins apresentaram congestão vascular e cilindros proteináceos nos tufo glomerulares e na luz dos túbulos.²⁶ No presente estudo, as dosagens séricas de creatinina e ureia foram mais elevadas nos grupos expostos à alta concentração oral de glifosato e alteração tubular ocorreu somente nos grupos expostos. A contagem de NORs foi maior nos grupos expostos à média e alta concentração, mostrando uma maior necessidade de reepitelização dos túbulos nestes animais. Embora não tenha havido diferença significativa entre as vias de exposição (oral e inalatória) na contagem de NORs, esta contagem foi maior no grupo exposto a alta concentração oral, o mesmo que apresentou maior incidência de necrose tubular (30% dos animais) e maiores níveis séricos de creatinina e ureia. Estes nossos dados reafirmam a possibilidade de dano renal, tanto funcional quanto morfológico mediante a exposição ao glifosato, mesmo utilizando concentrações indicadas na bula do produto e que altas concentrações são mais danosas a rim.

Num estudo com ratos Sprague-Dawley expostos ao glifosato na água de beber, os machos apresentaram danos ao fígado e rim de forma mais aguda do que as fêmeas, com aumento da taxa de morte prematura destes animais.¹⁶ AST e ALT são marcadores importantes de dano hepático e os genes tem um papel importante nas diferenças nos níveis sanguíneos destes marcadores entre os gêneros.³⁰ Estudos com animais⁴ e com seres humanos¹ mostraram que as fêmeas apresentam níveis mais elevados de ALT e AST frente a exposição a agentes hepatotóxicos. Os níveis de ureia e creatina também podem ser afetados pelo gênero em seres humanos.²⁹ Em um estudo com exposição de ratos a cisplatina, as fêmeas apresentaram níveis mais elevados de ureia e creatina do que os machos.¹¹ Assim como em outros estudos, observamos níveis mais elevados de AST, ALT e ureia nas fêmeas expostas ao glifosato do que nos machos, porém não houve diferença entre os sexos em relação aos parâmetros histológicos avaliados (dano estrutural e contagem de NORs). Nossos dados mostram que as fêmeas

apresentam mais dano funcional frente à exposição ao glifosato, porém isto não se reflete em um maior dano estrutural.

Vários estudos demonstraram que a exposição ao glifosato acarreta em estresse oxidativo em vários órgãos e tecidos, incluindo o fígado e os rins.²⁷ A formação de espécies reativas de oxigênio associada à exposição glifosato podem justificar as alterações hepáticas e renais encontradas em nosso estudo e em outros estudos realizados anteriormente.

No presente estudo não observamos alterações histológicas no baço. Um estudo anterior com exposição crônica ao agrotóxico 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), com vias de exposição semelhantes ao nosso, também não observou alterações esplênicas.³ A ausência, nos animais expostos ao glifosato, de fibrose ou cirrose hepática, causas de hipertensão portal, o que pode levar a uma congestão esplênica (hiperplasia de polpa vermelha), e de inflamação nos órgão avaliados, o que pode levar a uma hiperplasia de polpa branca, podem justificar não termos observado alterações esplênicas.

Alguns estudos têm mostrado uma relação entre diabetes tipo II e exposição a várias classes de agrotóxicos (organofosforados, organoclorados, carbamatos e inseticidas) em seres humanos,^{6,7,12} sendo esta relação mais evidente em indivíduos obesos.²¹ Um estudo experimental em ratos com exposição crônica por seis meses ao 2,4-D mostrou atrofia das ilhotas de Langerhans nos animais expostos.³ Em nosso estudo, não observamos alterações pancreáticas nos animais expostos ao glifosato. Isto pode ser devido ao pâncreas não ser um órgão alvo deste agrotóxico quando utilizado em concentrações descritas na bula do produto ou ao tempo de exposição empregado em nosso estudo (75 dias). Estudos com exposição por tempo mais prolongado ao glifosato poderão esclarecer melhor se o pâncreas pode ser um órgão alvo deste agrotóxico ou não.

Com os dados do presente estudo, podemos concluir que a exposição a altas concentrações de glifosato, principalmente por via oral, causa maior dano hepático e renal (tanto a nível funcional quanto morfológico). As fêmeas apresentam mais alterações bioquímicas hepáticas e renais do que os machos mediante a exposição ao glifosato. O dano ocorre mesmo utilizando concentrações determinadas pelo fabricante.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado com fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Os autores agradecem a Ana Vanuire Rombi, do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela realização dos exames bioquímicos e aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes.

Conflito de interesses

Os autores declararam que não existe nenhum conflito de interesse.

Referências

1. **Attanasio R.** 2019. Sex differences in the association between perfluoroalkyl acids and liver function in US adolescents: Analyses of NHANES 2013-2016. *Environ Pollut* **254**(Pt B):113061. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113061>
2. **Benbrook C.** 2016. Trends in the use of glyphosate herbicide in the U.S. and globally. *Environ Sci Eur* **28**(1):3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
3. **Bonfim DJP, Magalhães LR, Chagas PHN, Serra FM, Benatti LAT, Nai GA.** 2020. Hepatic, renal, and pancreatic damage associated with chronic exposure to oral and inhaled 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-d): an environmental exposure model in rats. *Comp Clin Pathol* <https://doi.org/10.1007/s00580-020-03150-8>
4. **Brkić D, Szakonyne-Pasics I, Gašić S, Teodorović I, Rašković B, Brkić N, Nešković N.** 2015. Subacute and subchronic toxicity of Avalon(®) mixture (bentazone+dicamba) to rats. *Environ Toxicol Pharmacol* **39**(3):1057-66. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.03.004>.
5. **Deugnier Y, Turlin B.** 2007. Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol* **13**(35), 4755-4760.
6. **Evangelou E, Ntritsos G, Chondrogiorgi M, Kavvoura FK, Hernández AF, Ntzani EE, Tzoulaki I.** 2016. Exposure to pesticides and diabetes: A

- systematic review and meta-analysis. *Environ Int* **91**:60–68. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.013>
7. **Everett CJ, Matheson EM.** 2010. Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999-2004 national health and nutrition examination survey. *Environ Int* **36**(4):398–401. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.02.010>
 8. **German Federal Agency BfR.** 2014. The BfR has finalised its draft report for the re-evaluation of glyphosate. Available at http://www.bfr.bund.de/en/the_bfr_has_finalised_its_draft_report_for_the_re_evaluation_of_glyphosate-188632.html. Accessed 25 Jun 2020.
 9. **Hammer GD, McPhee SJ.** 2019. Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine, 8th edition. McGraw-Hill Education, New York
 10. **Jayasumana C, Gunatilake S, Siribaddana S.** 2015. Simultaneous exposure to multiple heavy metals and glyphosate may contribute to Sri Lankan agricultural nephropathy. *BMC Nephrology* **16**:103. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0109-2>
 11. **Jilanchi S, Talebi A, Nematbakhsh M.** 2018. Cisplatin Alters Sodium Excretion and Renal Clearance in Rats: Gender and Drug Dose Related. *Adv Biomed Res* **7**:54. https://doi.org/10.4103/abr.abr_124_17.
 12. **Juntarawijit C, Juntarawijit Y.** 2018. Association between diabetes and pesticides: a case-control study among Thai farmers. *Environ Health Prev Med* **23**:3. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0692-5>
 13. **Krüger M, Schrödl W, Neuhaus J, Shehata A.** 2013. Field investigations of glyphosate in urine of Danish dairy cows. *J Environ Anal Toxicol* **3**:186.
 14. **Landrigan PJ, Belpoggi F.** 2018. The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. *Environmental Health* **17**:51. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0392-z>
 15. **Mello FA, Quinallia G, Marion AL, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, Fagiani MAB, Mareco EA, Favareto APA, Rossi e Silva RC.** 2018. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* **51**(4). <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>
 16. **Mesnage R, Arno M, Costanzo M, Malatesta M, Séralini GE, Antoniou MN.** 2015. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage

- following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environ Health*. **14**:70. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0056-1>.
17. **Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE**. 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol* **84**:133-153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
 18. **Mesnage R, Renney G, Séralini G-E, Ward M, Antoniou MN**. 2017. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Scientific Reports* **7**:39328. <https://doi.org/10.1038/srep39328>.
 19. **Olorunsogo OO, Bababunmi EA, Bassir O**. 1979. Effect of glyphosate on rat liver mitochondria *in vivo*. *Bull Environ Contam Toxicol* **22**: 357–364.
 20. **Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS**. 2005. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. Available from: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Accessed 22 Ago 2015.
 21. **Park S, Kim SK, Kim JY, Lee K, Choi JR, Chang SJ, Chung CH, Park KS, Oh SS, Koh SB**. 2019. Exposure to pesticides and the prevalence of diabetes in a rural population in Korea. *Neurotoxicology* **70**:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.10.007>
 22. **Pegoraro CMR, Nai GA, Garcia LA, Serra FM, Alves JA, Chagas PHN, Oliveira DG, Zocoler MA**. 2018. Protective effects of *Bidens pilosa* on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Drug and Chemical Toxicology* **5**:1-11. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1526182>
 23. **Pingali PL**. 2012. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **109**(31): 12302-12308. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1107959108>
 24. **Ploton D, Menager M, Jeannensson P, Himberg G, Pigeon F, Adnet JJ**. 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. *Histochem J* **18**:5-14.

25. **R Development Core Team.** 2019. R Software: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna. Available from: <http://www.r-project.org>. Accessed 19 Mar 2020.
26. **Sribanditmongko P, Jutavijittum P, Pongraveevongsa P, Wunnapuk K, Durongkadech P.** 2012. Pathological and Toxicological Findings in Glyphosate-Surfactant Herbicide Fatality. A Case Report. *Am J Forensic Med Pathol* **33**: 234Y237.
27. **Tang J, Hu P, Li Y, Win-Shwe T-T and Li C.** 2017. Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. *Front. Physiol.* **8**:1083. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01083>
28. **Topal A, Atamanalp M, Uçar A, Oruç E, Kocaman EM, Sulukan E, Akdemir F, Beydemir Ş, Kılınç N, Erdoğan O, Ceyhun SB.** 2015. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicol Environ Saf* **111**:206-14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027>.
29. **Tzamaloukas AH, Malhotra D, Murata GH.** 1998. Gender, degree of obesity, and discrepancy between urea and creatinine clearance in peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* **9**(3):497-9.
30. **van Beek JH, de Moor MH, de Geus EJ, Lubke GH, Vink JM, Willemsen G, Boomsma DI.** 2013. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. *Behav Genet* **43**(4):329-39. <https://doi.org/10.1007/s10519-013-9593-y>.
31. **Wimalawansa SJ.** 2016. The role of ions, heavy metals, fluoride, and agrochemicals: critical evaluation of potential aetiological factors of chronic kidney disease of multifactorial origin (CKDmfo/CKDu) and recommendations for its eradication. *Environ Geochem Health* **38**:639–678. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9768-y>
32. **Wunnapuk K, Gobe GI, Endre Z, Peake P, Grice JE, Roberts MS, Buckley NA, Liu X.** 2014. Use of a glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity model to investigate a panel of kidney injury biomarkers. *Toxicology Letters* **225**: 192-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.12.009>

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "HEPATO E NEFROTOXICIDADE FRENTE À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D)", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3792 e tendo como participante(s) DANIEL JOSE PIMENTEL BONFIM (discente), LETICIA ROCHA MAGALHAES (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), LILIANE APARECIDA TANUS BENATTI (docente colaboradora inserida no projeto após aprovação e emissão do parecer final) e FERNANDA DE MARIA SERRA (discente inserida no projeto após aprovação e emissão do parecer final), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 10/5/2017.

Vigência do projeto: 04/2017 a 04/2020.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos Wistar albinos	0	200g	60 dias	M	Biotério Central - UNOESTE

Presidente Prudente/SP, 20 de Março de 2018


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI


Profa. Ma. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO – ARTIGO 1 - ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH



Impact factor: **3.056 (2019)**

Five year impact factor: **3.306 (2019)**

Instructions for Authors

Types of Papers

Peer-reviewed contributions:

- Research Articles (full papers)
- Short Original Communications and Discussion Articles
- Review Articles
- Research Communications

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

While submitting your paper you will be asked for three potential reviewers. Indicating three reviewers is mandatory.

- To authors from non-English language countries:

To have the best possible pre-requisition for the review process, please ask a native speaker to check the quality of the English, before you submit the complete paper.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
 - Please avoid acronyms in the title of your article
 - For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

Keywords

Please provide 6 to 8 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.

- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (Download zip, 188 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Additional Information Text Formatting

All manuscripts should be formatted containing continuous line numbering. Use the page and line numbering function to number the pages.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738.
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (Download zip, 3 kB)

Specific Remarks

- Online documents: wikipedia documents are not acceptable as references.
- LanguageReferences should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicatedZhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009) Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in Chinese)

Tables

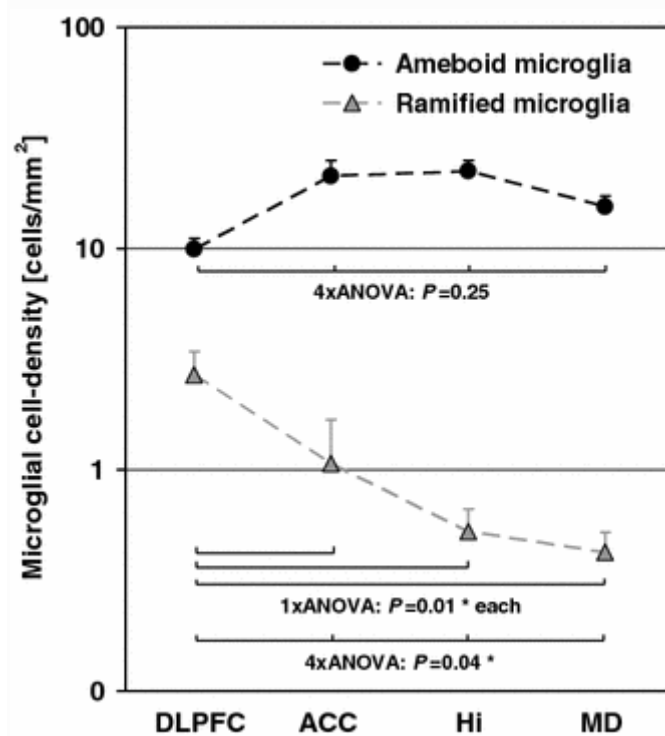
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

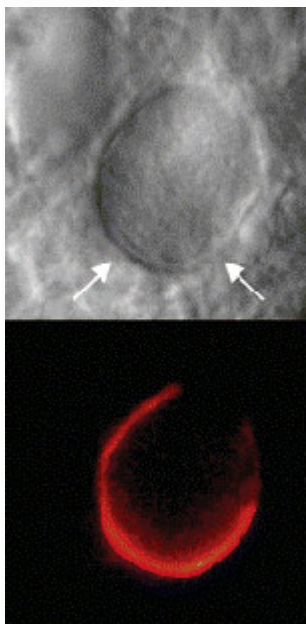
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



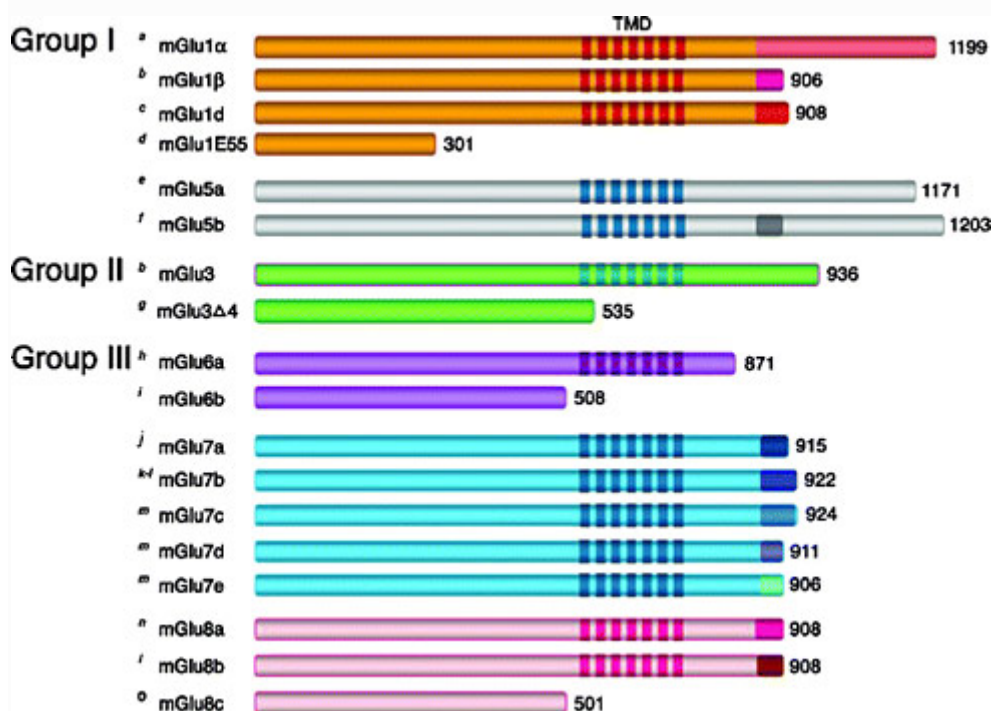
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Please note:

- Color art is free of charge for online and print publication.

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research

Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another

source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article

- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked “retracted” and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author’s institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author’s and article’s bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please

check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...];

Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to

include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Important note:

Please note that – contrary to the text above – according to the policy of ESPR, any addition/removal of authors or change in order list are prohibited during all the review process. The original authorship must remain the same during all the review process.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research Data Policy

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

ANEXO C – NORMAS DE PUBLICAÇÃO - ARTIGO 2 – COMPARATIVE MEDICINE



Comparative Medicine (CM)

Comparative Medicine (CM), an international journal of comparative and experimental medicine, is the leading English-language publication in the field and is ranked by the Science Citation Index in the upper third of all scientific journals. The mission of CM is to disseminate high-quality, peer-reviewed information that expands biomedical knowledge and promotes human and animal health through the study of laboratory animal disease, animal models of disease, and basic biologic mechanisms related to disease in people and animals.

The journal is published six times a year: February, April, June, August, October, and December. A winner of three national awards, *Comparative Medicine* is indexed in Index Medicus. Dr. Linda Toth is the editor in chief over CM and JAALAS; Dr. Ravi Tolwani of The Rockefeller University is the associate editor for CM. The production office for the journal is located at the AALAS national office in Memphis, TN. For more information about the journal, **contact us**.

- Average submission to final decision time: 55 days
- 540 pages printed in 2016
- 48% acceptance rate

CM and JAALAS General Information

The American Association for Laboratory Animal Science (AALAS) currently publishes two journals containing data-driven, peer-reviewed articles.

The types of articles accepted are **Case Studies, Research Reports, Overviews, and Letters to the Editor**.

The editorial style of AALAS journals is based on that described in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (seventh edition). Consult previous issues of the relevant journal for information not addressed in *Scientific Style and Format* or the following material.

Manuscript Preparation

Authors are encouraged to consult the **ARRIVE guidelines** in preparing their manuscript for review.

Access this **template** for an example manuscript.

Authorship

According to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) four criteria must be met to be designated as an author. These are:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; and
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and
- Final approval of the version to be published; and
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Additionally, all authors should be able to identify which co-authors are responsible for other portions of the work. If the contributor is unable to meet all four criteria, they should be recognized (with their permission) in the acknowledgment section.

For additional information regarding the roles of authors and contributors, please visit www.icmje.org.

Title page

Manuscript should be single spaced, with no page or line numbers On the first page of the manuscript, include the:

- Full Title—a concise informative description of the presented work including the common name of the animals used (add genus and species in parentheses for nonhuman primates and species whose common name may be unfamiliar to readers)
 - The title should succinctly describe the study that was done or, for overviews, the topic that was reviewed. To be consistent with journal style, titles must adhere to the following guidelines:
 1. cannot include a subtitle (that is, a phrase followed by a colon and another phrase)
 2. cannot include abbreviations or define abbreviations
 3. cannot be a question
 4. cannot state the results or conclusions
- List of authors—the first name, middle initial (or first initial and middle name), and last name of each author
- Institutional affiliation of each author—the Department (or Program), Institution (or Company), City, State (or province), and Country (if not USA) at which the described work was done
 - Use superscripted Arabic numerals to indicate respective institutions
 - Spell out all locations in full
- Corresponding author—the person who readers can contact regarding information or reagents
- Indicate with * in the list of authors and provide that author's email address
- Running title—a descriptive phrase of no more than 72 characters (including spaces) to be used as a running head on each printed page
- Abbreviations and acronyms—a list of all nonstandard acronyms and abbreviations used throughout the manuscript and their definitions
 - **Standard Abbreviations** file need not be included on the title page
 - Do not abbreviate terms used fewer than five times in a manuscript

Abstract

Provide a single paragraph (no subheadings) of 300 words or fewer that sequentially summarizes the background, rationale, methods, results, and conclusions of the work.

Body

Use coded or nonproprietary language throughout the manuscript. Cite the proprietary, brand, or vendor name associated with an assay, instrument, machine, service, or compound only in Materials and Methods.

Please do not include website links within the body of the manuscript. Online resources should be cited and added to the reference section. For specific details, refer to previous issues of JAALAS or CM for examples of citation formats.

Define all nonstandard abbreviations and acronyms at first use. Limit the number of novel abbreviations used. Refer to the list of Standard Abbreviations for abbreviations that can be used without definition.

The length of and subsections comprising the body of the manuscript will vary depending on the type of article submitted. The manuscript may include some or all of the following sections:

Introduction

Provide the rationale and supporting background for the presented work and its importance and relevance.

Extensive reviews of the existing literature are inappropriate for research reports and case studies/reports.

Materials and Methods

Describe the animals, husbandry, tests, equipment, procedures, reagents, and services used in sufficient detail to permit replication of the work, with citation of published references as consistent with brevity and clarity.

- Clearly define use of the term 'specific pathogen-free' by including specific criteria (for example, tests, organisms surveilled, housing, husbandry conditions) or citing publications providing that information
- Include statistical methods where relevant and attribute (name of software program used and name and location of vendor) or reference them appropriately. In addition, provide the P value used to define statistical significance

Case studies involve multiple occurrences affecting 1 or more animals, with a follow-up investigation and characterization. The body of a case study contains the following sections: a brief introduction, a description of the case under the heading case report, materials and methods, results, and discussion. Methods and results sections should relate to the follow-up work (that is, the study that was conducted).

Include a statement regarding Institutional Animal Care and Use Committee approval (or equivalent) for procedures and protocols involving animals.

Provide assurances regarding **humane care and use of animals** , citing AALAS Position Statements and national standards as appropriate to the country in which the work was performed.

For research involving human subjects, identify the committee that approved the experiments and include a statement that informed consent was obtained from all subjects, that measures are in place to protect the identity of all subjects, and that no coercion was used to solicit subjects.

Provide the vendor's name and location for any sole-source item or service.

Insert callouts (in parentheses) for all Figures and Tables, which are numbered in order of their mention in the text.

Follow **correct nomenclature** for laboratory animals, genes, genetic markers, alleles, mutations, and microbes.

Wherever possible, use International System of Units base and derived units for numerical data.

Results

Use headings as needed to guide readers.

Accompany statements of differences between groups with appropriate statistics.

Summarize selected data from Figures and Tables in the Results section; do not merely repeat all information presented in graphics.

Save interpretation of data for the Discussion section.

Discussion

Begin the Discussion with a brief summary of the key findings.

Limit discussion of study findings to those that have been presented in the Results.

Address any limitations of the study and directions for potential future research.

Acknowledgments

Recognize (with their permission) people and institutions whose contributions of funding, technical assistance, reagents, data collection and analysis, and other services do not meet the criteria for authorship.

References

Provide complete and accurate bibliographic information for all cited materials. Only information that is published or is already accepted for publication (that is, "in press") can be used as references. We will not accept citations of unpublished information or materials (for example, personal communications, unpublished data, manuscripts still undergoing review) in a reference list or parenthetically in the text.

Journals published by AALAS follow a modified version of the citation style found in Scientific Style and Format. Refer to previous issues of JAALAS or CM or

the **Example References Word file** for specific types of referenced material. Organize references numerically in strict ("letter-by-letter") alphabetical order. List references by the same author(s) chronologically.

Journal style template files are available for EndNote.

- EndNote template file: download from the **EndNote website** (enter Comparative Medicine in the box titled Publication Name and click on Find Style)

Figure Legends

Provide complete, concise descriptions of all figures in order of their mention in the text. Define additional abbreviations or acronyms.

Indicate the original magnification of images by citing the magnification factor in the legend or by using scale bars within images themselves.

Use of previously published material (in whole or part) must be cited in the legend

and accompanied by a signed **Permission for Use form**.

Appropriate manipulation of digital images must be made explicit in the accompanying legend.

Supplementary Materials

All articles published in the AALAS journals must be self-contained and presented in a manner adequate for comprehensive review. Every effort should be made to avoid the use of supplementary material and to incorporate all relevant material into the main text.

Article-relevant material that is valuable to the manuscript but difficult or impossible to include in the typeset manuscript can be made available online as Supplemental Materials.

- Candidates for inclusion in Supplemental Material are videos or other multimedia objects and large data sets or tables.
- Supplemental materials may not include text or information that is essential to either completeness of the article or the validity of the conclusions.
- Supplementary material is subject to the same editorial standards and peer-review procedures as the print publication

Supplemental material must be submitted concurrently with the article itself.

- The article cover letter should present a justification for the inclusion of supplementary material.
- All supplementary material must be appropriately called out from the main text (for example, Figure S1).
- References cited only in supplementary material should be incorporated into the main reference section with the designation "supplementary" at the end of the entry.

Tables

Tables must be generated by using the Table function of Microsoft Word. Tables generated by using other programs (for example, Microsoft Excel) will be returned to the authors for reformatting, potentially delaying publication of the article. Please

see example

Number tables in order of their mention in the text and provide a brief title describing the information presented. Footnotes to tables are indicated by using superscript lowercase letters.

Tables are used to present numerical data and are not wholly narrative. According to

AALAS journal style, narrative information in a **tabular format** (for example, descriptions of scoring systems, experimental protocols) is submitted as a figure.

Figure Preparation

Figures are submitted electronically, separately from the manuscript. Do not embed any images within the manuscript file. Also, all submitted micrographs must be in color; black and white micrographs will not be accepted for publication.

File formats accepted are TIFF (preferred), EPS, high-resolution JPG, and high-quality PDF (no image compression). PowerPoint slides, Excel graphs, and images embedded in Word are not acceptable.

Minimal resolution: 600 dpi for line art (for example, graphs in black and white); 300 dpi for color (save as CMYK; not RGB or indexed) or grayscale images (save black and white images as grayscale); 1200 dpi for scanned line art (save as TIFF). Photos taken with a digital camera must have a resolution of at least 4 megapixels.

Create figures with a width of 89 mm (single column) or 187 mm (double column); do not enlarge created figure to meet these dimensions.

Designate panels of figures by using uppercase letters (no periods) in the upper left corner of the image; keep size of lettering and other labels (at least 3 mm in height as submitted) consistent between panels of a figure and between figures. Embed fonts within digital images.

Indicate the magnification factor of an image by including an appropriate size bar in its lower right corner.

Minimize the use of color in charts, graphs, and drawings to that necessary for clarity of communication and ease of understanding. Use solid fill or percentage screens (not pattern or textured fills) and a minimum line weight of 0.5 pt throughout.

Below are items to consider when generating figures for publication purposes:

- 2 column figures need to be created with a width of 187 mm and a minimum resolution of 300 DPI. Single column figures need to be created with a width of 89 mm and a minimum resolution of 300 DPI.
- Photos taken with a digital camera must have a resolution of at least 4 megapixels.

- Export files from PowerPoint as a PDF only.
- Export files from SigmaPlot as a PDF only.
- Export files from GraphPad Prism as PDF only.
- Export files from Excel as PDF only.
- Save figures created in Word as PDFs.
- Figures need to be originally sized with the correct resolution. Figures cannot be resized or resolution increased after they have been created. This causes pixilation/resampling which will result in lower quality image.
- Do not paste images into Word/PowerPoint/Excel. Send the original source file.
- Word files are not acceptable formats for figures. Please provide the figures as individual files (Figure 1, Figure 2) in TIFF, JPEG, or PDF format.
- Remove background lines and titles from all graphs/

Additional information regarding generating and formatting figures is available by emailing **Brenda Johnson**.

Manuscript Submission

Letters to the Editor are submitted by email (journals@aalas.org; please specify whether the letter is intended for publication in CM or JAALAS in the subject line) or through the USPS (Letter to the Editor, CM or JAALAS; AALAS; 9190 Crestwyn Hills Drive, Memphis, TN, 38125).

Research Reports, Case Reports, Case Studies, and Overviews are submitted electronically through the Manuscript Central system. To avoid publication delays, ensure that all portions of the manuscript conform to the specifications in the Information for Authors.

To submit a manuscript for possible publication, you need

- A Microsoft Word file of the manuscript itself. Do not add line numbers to the file.
- All associated image files.
- A list of **MeSH** terms (maximum, 7) for use as key words appropriate for indexing of the article.
- Names, institutional affiliations, and email addresses (maximum, 4) of suggested persons to include or exclude as potential reviewers.

Submit all necessary files for CM manuscripts

at <http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-cm>. Submit files for JAALAS manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-jaalas>.

As part of the submission process, return signed copies of the Copyright Transfer and Declaration of Potential Competing Interests form by email (journals@aalas.org) or fax (901-334-5152).

The corresponding author must retain editable electronic copies of all text and illustrations used in the submitted manuscript.

Copyright and Competing Interests

The publisher of an original manuscript is generally recognized as the owner of the published material. Consistent with this convention, AALAS requires copyright ownership of all materials published in its journals. Authors must sign and return a copyright release form at the time of submission. Authors are responsible for obtaining the necessary permissions to reproduce previously published figures, tables, or sections of text.

In the interest of transparency, the AALAS journals have adopted a competing interests policy. A detailed copy of the policy can be found [here](#) . Authors are asked to disclose any competing interest related to a manuscript at the time of submission by completing and signing the Declaration of Competing Interests form and the copyright transfer form found [here](#) and faxing it in to the editorial office (901-334-5152). Reviewers are requested to recuse themselves in cases where a significant conflict of interest, financial or otherwise, exists. However, financial interests do not necessarily disqualify a reviewer from evaluating a paper. Reviewers are asked to inform the editor of any interest which might be perceived as relevant. Editors will then consider these statements when weighing reviewers' recommendations.